



Universidad Pablo de Olavide

Facultad de Ciencias Experimentales
División de Neurociencias
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

Janet Mabel Angulo López

EFFECTO DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NORADRENÉRICO SOBRE EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO EN RATONES ADULTOS.

Tesis dirigida por:
Eduardo Domínguez del Toro

Sevilla, 2015

Don Eduardo Domínguez del Toro, Profesor titular del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide

CERTIFICA:

que el presente trabajo titulado **“EFECTO DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO SOBRE EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO EN RATONES ADULTOS”**, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión por Dña. Janet Mabel Angulo López, Licenciada en Psicología por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima, Perú y Homologada en la Universidad de Sevilla, España, y considera que reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral

Sevilla. 16 de Noviembre de 2015.

Fdo.: Eduardo Domínguez del Toro

Dedicado:

A mis Padres, Leo e Hilda, por su apoyo incondicional en mi vida profesional y personal, cuando estaba cerca y ahora que me encuentro lejos de ellos.

A mi esposo y pareja incondicional, Diego, por apoyarme en todo momento y a mi pequeña Daniela que me impulsa a levantarme y seguir luchando cada día más.

A mis hermanos por su apoyo y espero que ellos también logren sus metas anheladas. Y a Marina Torres por apoyar en la presente investigación.

A Eduardo por ser el que me dio la oportunidad de investigar y contagiarme del espíritu incansable de conocimiento que tiene. Además de su apoyo en todo momento.

“Todos nuestros sueños pueden convertirse en realidad si tenemos la valentía de perseguirlos”

Walt Disney (1901-1966) fue un productor, director, guionista y animador estadounidense, con posibles orígenes españoles. Es considerado un icono internacional dentro del cine de animación infantil.

Agradecimientos:

Al Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la UPO, que me brindó la oportunidad de realizar la presente investigación al utilizar sus instalaciones y principalmente el laboratorio.

Al CABD, por permitirme realizar algunos experimentos en las instalaciones de su laboratorio y permitir habitar en sus instalaciones los sujetos (ratones) de la presente investigación.

A los Profesores del Máster de Neurociencias, por brindarme aquellas clases inolvidables, la oportunidad de conocer las investigaciones que realizan, además profundizar en el área neurológica y aprender mucho de ellos. José María Delgado, Agnès Gruart, Eduardo Domínguez del Toro, José Luis Cantero, José Ángel Armengol, Antonio Prado, entre otros.

Y a todo el personal del laboratorio por su recibimiento y apoyo cuando necesité y consulté sobre la tesis.

“Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes.”

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.”

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934). Médico español. Premio Nobel de Medicina en 1906.

Esta Tesis se realizó gracias a la beca/ ayuda para la Formación Doctoral y Colaboración con el Centro de Estudios de Postgrado y con las Direcciones de Másteres Universitarios 2009-2012.

Además debo mencionar la ayuda de movilidad del Programa de Movilidad Académica entre Universidades Andaluzas y latinoamericanas asociadas a la AUIP 2010.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934). Médico español.

Premio Nobel de Medicina en 1906.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA	26
1.1.1. Evolución Histórica de Aprendizaje y Memoria	26
1.1.2. Definición de Aprendizaje y Memoria	31
1.1.3. Tipos de Memoria y Aprendizaje	32
1.1.4. Procesos de Memoria y aprendizaje	34
1.1.5. Aprendizaje Asociativo	37
1.1.6. Formas de Aprendizaje Asociativo	37
1.2. SISTEMA ADRENERGICO	47
1.2.1. Catecolaminas	47
1.2.2. Receptores Adrenérgicos	49
1.2.3. Vías Noradrenérgicas, el <i>Locus Coeruleus</i>	54
1.2.4. Desarrollo pre y postnatal del Sistema noradrenérgico	60
1.2.5. Trastornos neurológicos y psiquiátricos	63
1.3. CLONIDINA	65
1.3.1. Definición de Clonidina	65
1.3.2. Metabolismo de la clonidina	66
1.3.3. Efectos secundarios de la clonidina	67
1.3.4. Clonidina y receptores imidazólicos	67

1.3.5.	Uso de la clonidina en el embarazo o la lactancia	68
1.3.6.	Receptores imidazólicos y receptores adrenérgicos y efectos en el desarrollo	71
1.4.	ETANOL Y CLONIDINA	76
1.4.1.	Círculo de recompensa cerebral y drogas de abuso	76
1.4.2.	El alcohol como droga de abuso	78
1.4.3.	Efectos del alcohol sobre el Sistema Nervioso Central	82
1.4.4.	Abstinencia de alcohol y relación con la clonidina	84
2.	OBJETIVOS	91
2.1.	Objetivo general	93
2.2.	Objetivos específicos	93
3.	METODOLOGÍA	95
3.1.	Sujetos experimentales	97
3.2.	Caracterización del fenotipo motor comportamental en ratones adultos	98
3.3.	Diseño experimental	100
3.3.1.	Analgesia (test de la placa caliente o Hot Plate)	100
3.3.2.	Prueba motora: actímetro	102
3.3.3.	Relación del Sistema Adrenérgico y el aprendizaje asociativo	104
3.3.3.1.	Prueba de sobresalto e inhibición por sobresalto	104

	Índice
3.3.3.2. Reconocimiento de Objetos	108
3.3.3.3. Evitación pasiva	110
3.3.3.4. Condicionamiento del reflejo palpebral	112
3.3.3.4.1. Cirugía	112
3.3.3.4.2. Procedimiento quirúrgico para la implantación de electrodos periféricos	113
3.3.3.4.3. Respuestas reflejas palpebrales	114
3.3.3.4.4. Técnica de Registro	115
3.3.4. Condicionamiento de Preferencia de Plaza: prueba comportamental y de memoria	117
3.3.5. Comportamiento Social	120
3.3.5.1 Intruso	120
3.3.5.2 Prueba de Etanol	122
3.4. Perfusión y preparación de Histología	123
3.5. Análisis estadístico	124
4. RESULTADOS	125
4.1. Analgesia, hot-plate (Test de Placa Caliente)	128
4.2. Pruebas motoras: Intervención del Sistema Adrenérgico en la actividad exploratoria	131
4.2.1. Actímetro (Prueba de Campo abierto)	131
4.3. Estudio de la relación del Sistema adrenérgico y el aprendizaje	134

Índice

asociativo	
4.3.1. Evitación Pasiva	134
4.3.2. Reconocimiento de objetos	136
4.3.3. Prueba de sobresalto e Inhibición por prepulso	139
4.3.4. Condicionamiento clásico del Reflejo palpebral	142
4.4. Pruebas sociales y comportamentales	145
4.4.1. Test del Intruso	145
4.4.2. Condicionamiento de preferencia de Plaza	147
4.4.3. Prueba de Etanol	149
5. DISCUSIÓN	153
5.1. Participación del Sistema Noradrenérgico en la analgesia	160
5.2. Participación del Sistema Adrenérgico en la Actividad Exploratoria	162
5.3. Participación del Sistema noradrenérgico en la memoria y aprendizaje asociativo	163
5.4. La clonidina afecta la respuesta o comportamiento social y acentúa la tendencia a la adicción	168
6. CONCLUSIONES	173
7. BIBLIOGRAFÍA	177
8. WEBGRAFÍA	197

RESUMEN

Con respecto a la participación del sistema noradrenérgico pontino en funciones cognitivas, mucho se ha discutido sobre su participación funcional en procesos que van desde la mera vigilia, pasando por procesos de atención y memoria. La propuesta más reciente establece, a partir de registros realizados in vivo, que la actividad fásica de las neuronas del locus coeruleus resetean la actividad de circuitos neuronales corticales, permitiendo o facilitando la elaboración de respuestas conductuales. De cara a los procesos que ocurren durante el aprendizaje asociativo (como en el condicionamiento del miedo) o en la consolidación de la memoria espacial en el hipocampo (con la piscina de Morris) se ha investigado fundamentalmente la participación de los receptores beta adrenérgicos. Lo mismo se ha hecho en la única aproximación al condicionamiento clásico palpebral, usando un paradigma de demora, que implica la participación del cerebelo. En un trabajo reciente de nuestro grupo se ha demostrado que la inactivación del sistema noradrenérgico durante el desarrollo postnatal generaba un retraso en el desarrollo psicomotor de los ratones.

El objetivo general de nuestro trabajo consiste en reafirmar la importancia de la maduración del sistema alfa-adrenérgico, evaluando los efectos comportamentales y cognitivos en el ratón adulto tras la administración crónica, durante su desarrollo postnatal temprano, del fármaco clonidina, un agonista del sistema α_2 adrenérgico. Se espera de nuestro estudio que los ratones tratados postnatalmente con clonidina presenten, aparte de los déficits motores descritos previamente en ratas (como modelo) un retraso generalizado en tareas que impliquen el aprendizaje asociativo.

De los resultados obtenidos se desprende que las respuestas reflejas (palpebral, de sobresalto) aparecen en los ratones Clonidina con retraso. Los ratones clonidina son hiperactivos e hiperreactivos. En todas las pruebas relacionadas con el aprendizaje, han mostrado problemas de memoria a largo

Resumen

plazo. Finalmente, los ratones clonidina muestran una tendencia a consumir más etanol que el grupo control.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los retos a los que se enfrenta la Neurociencia de los últimos tiempos es el de comprender cómo el cerebro elabora el comportamiento y cuáles son los mecanismos neuronales mediante los que diversas estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC) hacen posible el aprendizaje de nuevas tareas motoras. En los últimos años, se ha afianzado la teoría de que la activación del sistema noradrenérgico pontino, aparte de influir en el estado atencional del individuo, facilita la reorganización de las redes neuronales corticales, influyendo en la elaboración de respuestas adaptativas y cognitivas. No deja de ser importante a la hora de explicar dicha función el conocimiento de cómo se organizan y estructuran, morfológica y funcionalmente, estos centros nerviosos durante el desarrollo del individuo, para así poder explicar ciertas anomalías congénitas que llevan asociados déficit cognitivos.

Con respecto a la participación del sistema noradrenérgico pontino en funciones cognitivas, mucho se ha discutido sobre su participación funcional en procesos que van desde la mera vigilia, pasando por procesos de atención y memoria, para culminar con modelos complejos relativos a la predicción de errores, toma de decisiones e incertidumbre de los sucesos inesperados (revisado recientemente en Bouret y Sara, 2005; Aston-Jones G., 2005). La propuesta más reciente establece, a partir de registros realizados in vivo, que la actividad fásica de las neuronas del locus coeruleus resetean la actividad de circuitos neuronales corticales, permitiendo o facilitando la elaboración de respuestas conductuales (Bouret y Sara., 2004; 2005). De cara a los procesos que ocurren durante el aprendizaje asociativo (como en el condicionamiento del miedo) o en la consolidación de la memoria espacial en el hipocampo (con la piscina de Morris) se ha investigado fundamentalmente la participación de los receptores beta adrenérgicos (Lalumiere et al., 2004; Ji et al., 2003). Lo mismo se ha hecho en la única aproximación al condicionamiento clásico palpebral, usando un paradigma de demora, que implica la participación del cerebelo (Cartford et al., 2004b).

Relacionado con las proyecciones coeruleus-corticales, se ha descrito cómo los receptores alfa-adrenérgicos están implicados en la respuesta de sobresalto y en la inhibición por prepulso (Sallinen et al., 1998; nuestros propios

resultados). Más aún, se ha descrito cómo estas respuestas se ven afectadas en el adulto por tratamiento postnatal con anti sentido de estos receptores inyectado en el locus coeruleus (Shishkina et al., 2004). El tratamiento postnatal con dicho anti sentido afecta no sólo a las respuestas de sobresalto, sino al desarrollo de pruebas en laberinto y a las conductas sociales, entre otras (Shishkina et al., 2001). Igualmente se ha descrito la implicación de los receptores alfa2 (α_2) en el Trastorno de Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH) (Bruno y Hess, 2006). De este modo, parece que se ha abierto una nueva línea de investigación, en la que se le da un papel importante a estos receptores en procesos relacionados con el aprendizaje. Algunos autores han estudiado el efecto inhibitor de los agonistas alfa-adrenérgicos sobre la expresión del condicionamiento del miedo participado por la amígdala (Schulz et al., 2002) y esta aproximación coincide con nuestra hipótesis de que los receptores α_2 -adrenérgicos están jugando un papel decisivo en la adquisición de respuestas motoras condicionadas. Para ello, investigaremos la participación de dichos receptores en los procesos que subyacen al aprendizaje motor, usando la técnica del condicionamiento clásico palpebral, con un paradigma de traza, el cual requiere la participación de estructuras alejadas del locus coeruleus, como es el hipocampo (Munera et al., 2001; Domínguez del Toro et al., 2004).

Los receptores α_2 adrenérgicos se sobre expresan momentáneamente en zonas proliferativas en el cerebro en desarrollo. Tanto su estimulación (Gorter et al., 1990) como su bloqueo (Soto-Moyano y otros, 1991) durante este periodo alteran el desarrollo de circuitos neuronales, la conectividad sináptica y las respuestas neuronales. Durante el desarrollo postnatal, crítico para el desarrollo conductual y neuroendocrino, los receptores adrenérgicos α_2 alcanzan los valores máximos de expresión en el tronco del encéfalo (Happe et al., 1999; Iushkova y Dygalo, 1995) y se han propuesto como posibles reguladores de procesos durante el desarrollo (Dygalo et al., 2000; Happe et al., 2004). La manipulación neonatal de dichos receptores en la zona del puente ha demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina et al., 2001; Shishkina et al., 2002; Shishkina et al., 2004).

Según Gorter et al., (1990), la reducción neonatal de NA por inyección subcutánea diaria de clonidina conlleva a una hipersensibilidad de NA en las células CA1 del hipocampo, afectando de forma permanente a procesos de plasticidad y en el kindling epileptogénico en adultos. Estos experimentos demuestran una afectación funcional de una estructura fundamental para el aprendizaje. Recientemente el grupo dirigido por el Dr. Domínguez del Toro ha demostrado que el tratamiento postnatal con clonidina produce, en ratones, un retraso en el desarrollo psico-motor y defectos en la memoria a corto plazo en ratones jóvenes.

El objeto general de nuestro trabajo consiste en reafirmar la importancia de la maduración del sistema alfa-adrenérgico, evaluando los efectos comportamentales y cognitivos en el ratón adulto tras la administración crónica, durante su desarrollo postnatal temprano, del fármaco clonidina, un agonista del sistema α_2 adrenérgico. Se espera de nuestro estudio que los ratones tratados postnatalmente con clonidina presenten, aparte de los déficits motores descritos previamente en ratas (como modelo), un retraso generalizado en tareas que impliquen el aprendizaje asociativo.

1.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

1.1.1. Evolución histórica del Aprendizaje y la Memoria

El estudio teórico de la memoria y el aprendizaje se inició desde los tiempos de Platón y Aristóteles. En las teorías del conocimiento de este último se hace alusión por primera vez a distintos niveles de conocimiento (conocimiento sensible vs entendimiento), pues, para Aristóteles, el verdadero saber estaba más allá de la sensación y la simple experiencia, pues además implica el conocimiento acerca de la causa y motivo de los sucesos u objetos. Además señaló que el fundamento del aprendizaje y la memoria son las asociaciones entre dos sucesos (como ocurre entre el rayo y el trueno), sin embargo, hasta antes del siglo XIX el estudio de la memoria sólo se limitaba a métodos más empíricos y filosóficos que científicos, es decir, para su estudio se utilizaban métodos como la lógica, la introspección, la comparación, la reflexión, etc. Fue hasta el siglo XIX que comenzaron los primeros reportes y estudios respecto a la memoria y sus trastornos. En realidad, la noción sobre los distintos tipos o sistemas de memoria no es nueva y se puede encontrar ya en la literatura de los siglos XVIII y XIX, en escritos psicológicos que distinguen, por ejemplo, la memoria de los hábitos (habilidades mecánicas). De esta época son de destacar los siguientes autores: Hermann Ebbinghaus, quien en 1885 fue el primero en realizar estudios experimentales sobre la memoria de repetición verbal en seres humanos, utilizando sílabas sin sentido, y además describe por primera vez la mejoría progresiva del rendimiento durante la adquisición de nuevas tareas o curva de aprendizaje, William James (1890), quién, en su *Tratado de Psicología*, fue pionero al proponer la distinción entre memoria de corto y largo plazo, Sergei Korsakoff, quién describe, junto con Carl Wernicke, el síndrome amnésico (acompañado de ataxia y oftalmoplejía), que actualmente lleva su nombre (Síndrome de Wernicke–Korsakoff) y además propone el estudio de los trastornos de memoria (amnesias) como un medio importante para conocer los procesos mnemónicos normales. Pero quizá uno de los exponentes más importantes de esta época, y menos reconocidos en el medio científico, es el biólogo alemán Richard Semon, al que se atribuye la autoría de uno de los

términos más utilizados en la bibliografía actual de la memoria: *el engrama*. De hecho, en sus teorías distinguió tres aspectos diferentes que componían los procesos de memoria: la *engrafía*, que representaría el proceso de codificación de la información, el *engrama* que representaría todos los cambios que ocurren en el Sistema Nervioso y que preservan los efectos de la experiencia, y la *ecforia*, que representaría la recuperación de información; en su teoría también propuso que para que ocurriera la *ecforia* de forma eficaz (recuperación) sería necesario que se reunieran nuevamente las condiciones que prevalecían en el momento de la *engrafía* (adquisición). Además también propuso ideas novedosas sobre el beneficio de la repetición en la memoria, sin embargo, su teoría recibió muy poco apoyo en su época lo cual se ha reflejado en el desconocimiento de sus contribuciones hasta nuestros días. A pesar de todas estas contribuciones, hasta este momento, a los procesos de memoria no se les reconocía un sustrato anatómico específico dentro del Sistema Nervioso. La primera asociación anatómica entre las lesiones cerebrales focales (específicamente del lóbulo temporal) y la memoria, se atribuye a Bekhterev, en 1899, quién demostró en un paciente cuyo principal problema era una alteración grave de la memoria reciente, la presencia de lo que él denominó reblandecimiento de áreas corticales específicas como el uncus, el hipocampo y áreas adyacentes de la corteza cerebral temporal.

A principios del siglo XX, la corriente científica del conductismo, con sus principales exponentes Thorndike, Pavlov, Watson y Skinner estudiaron las características y componentes de un tipo particular de aprendizaje y memoria, el que se deriva de la asociación repetida entre un estímulo y una respuesta (condicionamiento clásico) o entre un estímulo y una conducta (condicionamiento operante). Sin duda los conocimientos aportados por la corriente del conductismo fueron de los más importantes en los inicios del siglo XX, sin embargo, merece la pena señalar las aportaciones del novelista francés Marcel Proust (1913) quien realizó descripciones teóricas trascendentes y muy novedosas acerca del fenómeno de la experiencia consciente. En su serie de novelas que reciben el nombre de “En busca del Tiempo perdido”, se establecen las bases de lo que él denominó “memoria involuntaria” que consistía en una memoria basada en la adquisición supraconsciente de información, es decir,

Introducción

información cuya adquisición no ha sido dirigida por la atención o por la volición inteligente del sujeto y a la cual, eventualmente, puede tenerse acceso mediante algún estímulo externo que la hace evidente. Estas teorías estaban sin duda adelantadas a su tiempo y conforman hasta la actualidad uno de los terrenos más fértiles de polémica en el estudio de la memoria y su relación con la conciencia.

En 1861 Pierre Paul Broca descubrió que la lesión en la parte posterior del lóbulo frontal izquierdo (área de Broca) produce un déficit específico del lenguaje. Poco después se comprobó que otras funciones mentales, como la percepción y los movimientos voluntarios, se pueden relacionar con el funcionamiento de circuitos neuronales específicos en el cerebro.

La primera persona que obtuvo pruebas de que los procesos de la memoria podrían localizarse en regiones específicas del cerebro humano fue el neurocirujano Wilder Penfield. Penfield fue discípulo de Charles Sherrington, el neurofisiólogo inglés innovador que, en la transición del siglo XIX al XX, trazó el mapa de la representación motora de los monos anestesiados investigando de manera sistemática con electrodos la corteza cerebral y registrando la actividad de los nervios motores. En 1940, Penfield comenzó a aplicar métodos similares de estimulación eléctrica para localizar las funciones motoras, sensitivas y del lenguaje en la corteza cerebral de pacientes sometidos a cirugía del cerebro para el tratamiento de la epilepsia focal. Penfield exploró la superficie de la corteza en más de mil pacientes. En raras ocasiones encontró que la estimulación eléctrica de los lóbulos temporales producía lo que denominó una *respuesta de experiencia: un recuerdo coherente de una experiencia anterior*, estos estudios no convencieron a la comunidad científica.

Posteriormente Brenda Milner, colaboradora de Penfield, y el cirujano William Scoville estudiaron el primer caso acerca de los efectos sobre la memoria de la extirpación bilateral de partes de los lóbulos temporales en el paciente llamado H.M, un varón de 27 años, que había sufrido durante 10 años crisis convulsivas bilaterales del lóbulo temporal rebeldes al tratamiento como consecuencia de una lesión cerebral sufrida a los 9 años de edad al ser atropellado por alguien que circulaba en bicicleta. De adulto era incapaz de

trabajar o de llevar una vida normal. En la intervención quirúrgica se extirparon la formación del hipocampo, el núcleo amigdalino y partes del área de asociación multimodal de la corteza temporal en ambos lados. Las crisis de H.M. se controlaron mucho después de la cirugía, pero la extirpación de los lóbulos temporales mediales le dejó con un devastador déficit de memoria. Esta amnesia era específica, H.M. aún tenía una memoria a corto plazo normal y una memoria a largo plazo conservada para los acontecimientos que habían sucedido antes de la intervención, presentaba amnesia retrógrada, un excelente dominio del lenguaje, comprendiendo un variado vocabulario y su CI normal-alto previo no se modificó. Lo que le faltaba a H.M. era la capacidad de transformar la nueva memoria de corto plazo en largo plazo, era incapaz de retener más de un minuto la información sobre las personas, los lugares o los objetos. No podía reconocer a las personas a las que conoció después de la intervención, incluso cuando se reuniera con ellas una y otra vez. H.M. tenía una grave dificultad similar con la orientación espacial, le costó un año aprender el camino a una casa nueva. Todos los pacientes con extensas lesiones bilaterales de las áreas de asociación límbicas del lóbulo temporal medial, ya sea como secuela de la cirugía o de una enfermedad, tienen déficit similar de la memoria.

Milner pensó inicialmente que el déficit de memoria después de las lesiones bilaterales del lóbulo temporal medial afecta por igual a todas las formas de memoria. Pero demostró que no era así. Aun cuando los pacientes con lesiones del lóbulo temporal medial tienen graves déficit de la memoria, son capaces de aprender ciertos tipos de tareas y conservan lo aprendido durante tanto tiempo como las personas normales. El comportamiento conservado de la memoria se puso de manifiesto cuando Milner descubrió que H.M. podía aprender nuevas capacidades motoras a un ritmo normal. Por ejemplo aprendió a dibujar el contorno de una estrella mientras miraba su mano y la estrella en un espejo. Al principio con faltas pero después de días de entrenamiento su rendimiento es indistinguible del de los sujetos normales.

El trabajo posterior de Larry Squire et al. puso de manifiesto que las capacidades de la memoria de H.M. y de otros pacientes con lesiones mediales bilaterales del lóbulo temporal no se limitan a las capacidades motoras. Más bien

Introducción

éstos pacientes son capaces de varias formas de **aprendizaje reflejo simple**, entre ellos la habituación, sensibilización, condicionamiento clásico y condicionamiento operante. Además, son capaces de mejorar su rendimiento en tareas de percepción y funcionan bien en una modalidad de memoria, llamada *memoria de sensibilización*, en la que el recuerdo de las palabras o de los objetos mejora por la exposición previa a dichas palabras u objetos.

El psicólogo Endel Tulving fue el primero en desarrollar la idea de que la memoria explícita puede además clasificarse en episódica (la memoria para los acontecimientos y la experiencia personal) o semántica (la memoria para los hechos).

La lesión quirúrgica en el lóbulo temporal de H.M. engloba un cierto número de regiones, entre ellas el lóbulo temporal, la corteza temporal ventral y medial, el núcleo amigdalino y la formación del hipocampo (que comprende el hipocampo propiamente dicho, el subículo y la circunvolución dentada), así como las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocámpica. Puesto que las lesiones que se ciñen a cualquiera de estos sectores del lóbulo temporal medial son raras en los seres humanos, los estudios de las lesiones experimentales en los monos han ayudado a definir la contribución de las diferentes partes del lóbulo temporal a la formación de la memoria.

Morirme Mishkin y Squire produjeron en monos lesiones idénticas a las de H.M. y apreciaron defectos en la memoria explícita para los lugares y los objetos similares a los observados en H.M. La lesión aislada del núcleo amigdalino no tenía ningún efecto sobre la memoria explícita. Aunque el núcleo amigdalino almacena componentes de la memoria relacionados con la emoción, no almacena información objetiva. Por el contrario, la lesión selectiva en el hipocampo o las áreas de asociación polimodal en la corteza temporal con la que se conecta el hipocampo-cortezas perirrinal y parahipocámpica, producen una alteración clara de la memoria explícita.

Por ello se concluye que la memoria explícita se adquiere primero a través del procesamiento en una o más de las tres áreas de asociación polimodal de la corteza (las cortezas prefrontal, límbica y parietooccipitotemporal) que sintetizan

la información visual, auditiva y somática. Desde allí la información es transportada en serie a las cortezas parahipocámpica y perirrinal, luego a la corteza entorrinal, la circunvolución dentada, el hipocampo, el subículo y finalmente de nuevo hacia la corteza entorrinal. Desde aquí la información es devuelta hacia las cortezas del parahipocampo y perirrinal, y finalmente de nuevo a las áreas de asociación polimodal de la neo corteza.

El estudio de los procesos de aprendizaje animal ha experimentado un enorme avance en las últimas décadas tras la caída del conductismo. Tras liberarse del ajustado corsé que imponía el marco E-R, los psicólogos experimentales han incorporado el estudio del aprendizaje animal a la corriente mayoritaria del procesamiento de la información, que incorpora además nuevas áreas de estudio bajo la etiqueta general de cognición animal, como la categorización y el aprendizaje de conceptos abstractos (Pearce, 1994), la inferencia transitiva (McGonigle y Chalmers, 1977), el razonamiento analógico (Gillan, Premack y Woodruff, 1981) o la cognición social (Heyes, 1994). Sin duda, la incorporación de estos procesos ha enriquecido en gran medida el estudio del aprendizaje animal.

1.1.2. Definición de Aprendizaje y Memoria

Podemos definir el aprendizaje como un proceso de cambio relativamente permanente en el comportamiento de una persona generado por la experiencia (Feldman, 2005). En primer lugar, aprendizaje supone un cambio conductual o un cambio en la capacidad conductual. En segundo lugar, dicho cambio debe ser perdurable en el tiempo. En tercer lugar, otro criterio fundamental es que el aprendizaje ocurre a través de la práctica o de otras formas de experiencia (p.ej., observando a otras personas).

Debemos indicar que el término "conducta" se utiliza en el sentido amplio del término, evitando cualquier identificación reduccionista de la misma. Por lo tanto, al referir el aprendizaje como proceso de cambio conductual, asumimos el hecho de que el aprendizaje implica adquisición y modificación de conocimientos, estrategias, habilidades, creencias y actitudes (Schunk, 1991).

El aprendizaje es el proceso por el que adquirimos el conocimiento sobre el mundo. (Kandel, Eric R.)

La Memoria es el proceso por el que el conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado (Kandel Eric R.).

1.1.3. Tipos de la Memoria y Aprendizaje

La memoria se clasifica en memoria a corto plazo y a largo plazo, ésta a su vez se puede clasificar como implícita o explícita basándose en cómo se almacena y se recuerda la información (Kandel).

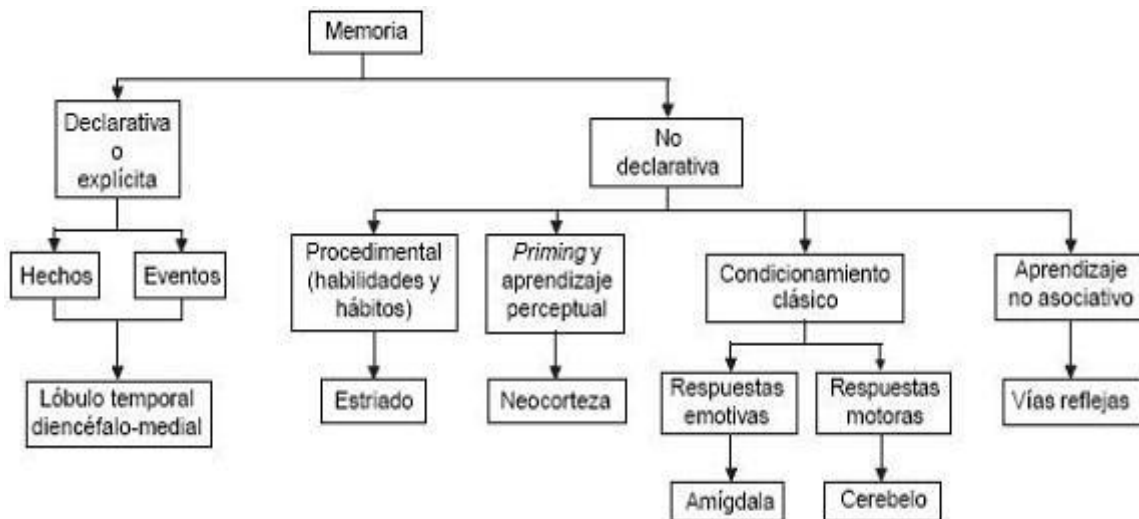


Figura 1. Taxonomía de los sistemas de memoria de largo plazo en los mamíferos (Squire, 2004)

Memoria Implícita (también conocida como *memoria no declarativa*) se refiere a la información de cómo realizar algo, un tipo de memoria que se recuerda de manera inconsciente. La memoria implícita aparece normalmente en el entrenamiento de capacidades reflejas motoras o perceptivas. Esta memoria es más rígida y está estrechamente conectada a las condiciones de los estímulos originales bajo los cuales se produjo el aprendizaje.

Memoria Explícita (o *memoria declarativa*) es el conocimiento objetivo de las personas, los lugares y las cosas, y lo que ello significa. Esto se recuerda

mediante un esfuerzo consciente y deliberado, la memoria explícita es muy flexible y afecta a la asociación de múltiples fragmentos y trozos de información.

El psicólogo Endel Tulving fue el primero en desarrollar la idea de que la memoria explícita puede además clasificarse en episódica (la memoria para los acontecimientos y la experiencia personal) o semántica (la memoria para los hechos). Utilizamos la memoria episódica cuando recordamos que ayer vimos las primeras flores de la primavera o que oímos la sonata claro de luna de Beethoven hace varios meses. Empleamos la memoria semántica para almacenar y recordar el conocimiento objetivo, el tipo de conocimiento que adquirimos en el colegio y en los libros (Kandel 1230-1231). Los estudios con pacientes humanos y animales de experimentación sugieren que el conocimiento almacenado como memoria explícita se adquiere primero a través del procesamiento en una o más de las tres áreas de asociación polimodal de la corteza (las cortezas prefrontal, límbica y parietooccipitotemporal) que sintetizan la información visual, auditiva y somática. Desde allí la información es transportada en serie a las cortezas parahipocámpica y perirrinal, luego a la corteza entorrinal, la circunvolución dentada, el hipocampo, el subículo y finalmente de nuevo hacia la corteza entorrinal. Desde aquí la información es devuelta hacia las cortezas del parahipocampo y perirrinal y, finalmente, de nuevo a las áreas de asociación polimodal de la neocorteza. Por tanto, en el procesamiento de la información para el almacenamiento de la memoria explícita la corteza entorrinal tiene una función doble, primero, es la principal fuente de aferencias hacia el hipocampo. La corteza entorrinal se proyecta a la circunvolución dentada a través de la vía perforante y de esta manera proporciona la aferencia vital a través de la cual la información polimodal de las cortezas de asociación alcanza el hipocampo.

En segundo lugar, la corteza entorrinal es también la principal vía de salida del hipocampo. La información que llega al hipocampo desde las cortezas de asociación polimodal y la que va desde el hipocampo a las cortezas de asociación convergen en la corteza entorrinal. Es por tanto comprensible que las alteraciones de la memoria por lesiones de la corteza entorrinal sean particularmente graves y que esta alteración afecte no simplemente a una sino a

Introducción

todas las modalidades sensitivas. De hecho, las alteraciones anatomopatológicas tempranas de la enfermedad de Alzheimer, la principal enfermedad degenerativa que afecta el almacenamiento en la memoria explícita, se producen en la corteza entorrinal.

El daño limitado a subregiones específicas del hipocampo es suficiente para alterar el almacenamiento de memoria explícita.

La memoria explícita se almacena en la corteza asociativa

El conocimiento semántico (objetivo) se almacena de forma distribuida en la neocorteza.

El conocimiento episódico (autobiográfico) sobre el tiempo y el lugar parece implicar a la corteza prefrontal.

El conocimiento explícito afecta al menos a cuatro procesos diferentes, tres cosas importantes sobre el conocimiento episódico y semántico. En primer lugar, no existe un almacén de memoria único y con un solo propósito. En segundo lugar, cualquier ítem de conocimiento tiene múltiples representaciones en el cerebro, cada una de las cuales corresponde a diferentes significados y a las que se puede acceder de manera independiente (a través de pistas visuales, pistas verbales u otras pistas sensoriales). En tercer lugar tanto el conocimiento semántico como el episódico son el resultado de al menos cuatro tipos diferentes, pero relacionados, de procesamiento: codificación, consolidación, almacenamiento y recuperación.

1.1.4. Procesos de Memoria y Aprendizaje

La codificación se refiere a los procesos por los que se presta atención y se elabora en el primer encuentro la información nueva aprendida. La extensión y la naturaleza de esta codificación son de vital importancia para determinar, cómo se recordará posteriormente, el material aprendido. Para que un recuerdo se mantenga y sea bien recordado, la información que llega debe ser codificada meticulosamente y en profundidad. Eso se realiza prestando atención y asociando la información de manera significativa y sistemática con el

conocimiento, que ya está bien establecido en la memoria, de manera que nos permita integrar la nueva información con lo que ya conocemos. Es más potente cuando tiene una motivación.

La consolidación, incluye los procesos que alteran la información estable con miras al almacenamiento a largo plazo. Implica la expresión de los genes y la síntesis de nuevas proteínas, induciendo cambios estructurales que almacenan la memoria de manera estable a lo largo del tiempo.

El almacenamiento comprende el mecanismo y los lugares por los que la memoria se conserva a lo largo del tiempo. Una de las manifestaciones destacables del almacenamiento a largo plazo es que parece tener una capacidad casi ilimitada, en cambio la memoria a corto plazo es limitada.

Finalmente la recuperación se refiere a los procesos que permiten la recuperación y la utilización de la información almacenada. La recuperación implica reunir distintos tipos de información que se almacenan de manera separada en diferentes lugares de almacenamiento. La recuperación de la memoria es muy similar a la percepción; un proceso constructivo y por tanto sujeto a la distorsión y, como la percepción, está sujeta a las ilusiones.

La memoria activa es una memoria a corto plazo necesaria tanto para la codificación como para el recuerdo del conocimiento explícito. Está compuesta de tres sistemas. Un sistema de control de la atención (o ejecutivo central) que se supone localizado en la corteza prefrontal y que centra activamente la percepción en acontecimientos específicos del medio. El sistema de control de la atención tiene una capacidad muy limitada (menos de una docena de ítems). El sistema de control de la atención regula el flujo de información a dos sistemas de repetición que mantienen el recuerdo para su utilización transitorio, el bucle articulatorio para el lenguaje y el bloc de notas visuoespacial para la visión y la acción.

El asa articulatoria es un sistema de almacenamiento con una huella de memoria que decae rápidamente donde se puede mantener mediante el habla subvocal la memoria de palabras y números.

El bloc de notas visuoespacial representa tanto las propiedades visuales como la localización espacial de los objetos a recordar. Se usa para almacenar la imagen de la cara de una persona en un cóctel.

La Memoria Implícita se almacena en circuitos perceptivos, motores y emocionales. Ésta no depende directamente de los procesos conscientes ni su recuerdo requiere la búsqueda consciente de la memoria. Este tipo de memoria se construye lentamente a través de la repetición en muchos ensayos y se expresa principalmente en la ejecución, no en palabras. Ejemplos de memoria implícita son las capacidades de percepción y motoras y el aprendizaje de ciertos tipos de procedimientos y reglas. Diferentes formas de memoria implícita se adquieren a través de diferentes maneras de aprender y afectan a regiones cerebrales distintas. Por ejemplo, la memoria adquirida a través del condicionamiento de temor, que tiene un componente emocional, se cree que implica al núcleo amigdalino. La memoria obtenida a través del condicionamiento operante requiere el estriado y el cerebelo. La memoria adquirida a través del condicionamiento clásico, sensibilización y habituación, implica órdenes de los sistemas sensoriales y motores implicados en el aprendizaje.

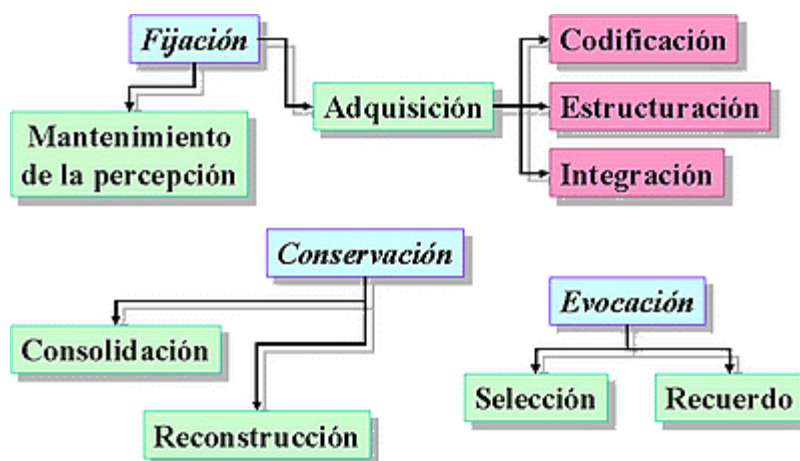


Figura 1.2

Procesos de la memoria y aprendizaje

1.1.5. Aprendizaje Asociativo

La memoria implícita puede ser no asociativa o asociativa: En el aprendizaje no asociativo el sujeto aprende sobre las propiedades de un único estímulo. En el aprendizaje asociativo el sujeto aprende sobre la relación entre dos estímulos o entre un estímulo y una conducta.

El aprendizaje no asociativo tiene lugar cuando un animal o persona se expone una vez o varias a un único tipo de estímulo. En la vida diaria son frecuentes dos formas de aprendizaje no asociativo, habituación y sensibilización. La habituación es una disminución de la respuesta a un estímulo benigno cuando este estímulo se presenta repetidas veces. Por ejemplo, la mayoría de las personas se sobresaltan cuando escuchan por primera vez el sonido de un petardo el cuatro del julio, pero, a medida que la celebración se desarrolla se acostumbran al ruido. La sensibilización (o pseudocondicionamiento) es la respuesta potenciada a una amplia variedad de estímulos después de la presentación de un estímulo intenso o nocivo. Por ejemplo, un animal responde de forma más enérgica a un estímulo táctil leve después de haber recibido un pellizco doloroso. Además, un estímulo de sensibilización puede anular los efectos de la habituación, un proceso conocido como deshabitación. Por ejemplo, después de que la respuesta de sobresalto ante un ruido ha disminuido por la habituación se puede recuperar la intensidad de la respuesta al ruido dando un fuerte pellizco.

La sensibilización y la deshabitación no son dependientes del momento relativo del estímulo intenso y del débil, no se precisa una asociación entre los dos estímulos. No todas las formas de aprendizaje no asociativo son tan simples como la habituación o la sensibilización. Por ejemplo, el aprendizaje por imitación, un factor esencial en la adquisición del lenguaje, no tiene un elemento asociativo obvio.

1.1.6. Formas de Aprendizaje Asociativo

Se han diferenciado dos formas de aprendizaje asociativo basándose en los procedimientos experimentales utilizados para establecer el aprendizaje. El condicionamiento clásico implica aprender una relación entre dos estímulos,

mientras que el condicionamiento operante supone aprender la relación entre la conducta de un organismo y las consecuencias de dicha conducta.

A) El condicionamiento clásico

Desde Aristóteles, los filósofos occidentales han pensado tradicionalmente que el aprendizaje se logra a través de la asociación de ideas. Este concepto fue desarrollado de manera sistemática por John Locke y la escuela filosófica de los empiristas británicos, importantes precursores de la psicología moderna. El condicionamiento clásico fue introducido en el estudio del aprendizaje a fines de siglo por el fisiólogo ruso Ivan Pavlov. Pavlov reconoció que el aprendizaje consistía frecuentemente en responder a un estímulo que en origen no desencadenaba respuesta. Cambiando el aspecto, el momento o el número de estímulos en un medio con estímulos estrechamente controlados y, observando los cambios en los reflejos simples seleccionados, Pavlov estableció un procedimiento a partir del cual se podían hacer inferencias razonables sobre la relación entre los cambios en la conducta (aprendizaje) y el medio (estímulo). De acuerdo con Pavlov, lo que los animales y los hombres aprenden cuando asocian ideas puede ser analizado en su forma más elemental estudiando la asociación de los estímulos.

La esencia del condicionamiento clásico es el emparejamiento de dos estímulos. El estímulo condicionado (EC), como la luz, el sonido o el estímulo táctil, se elige porque produce o bien una respuesta no manifiesta o bien una débil respuesta generalmente no relacionada con la respuesta que finalmente se aprenderá. El refuerzo, o estímulo no condicionado (ENC), como el alimento o una descarga en la pierna, se elige porque normalmente produce una respuesta potente, sistemática y manifiesta (la respuesta no condicionada), como salivación o retirada de la pierna. Las respuestas no condicionadas son innatas, se producen sin aprendizaje. Cuando un EC se sigue de un ENC, el EC comenzará a provocar una respuesta nueva o diferente llamada respuesta condicionada. Si el ENC es gratificador (alimento, agua), el condicionamiento se denomina apetitivo; si el ENC es nocivo (una descarga eléctrica), el condicionamiento se denomina defensivo.

Una manera de interpretar el condicionamiento es que emparejamientos repetidos de EC y ENC provocan que el EC se convierta en una señal anticipadora del ENC. Con la experiencia suficiente, un animal responderá al EC como si estuviera anticipando el ENC. Por ejemplo, si una luz se sigue reiteradamente de la presentación de un trozo de carne, finalmente la visión de la luz en sí misma hará que el animal salive. Por tanto, el condicionamiento clásico es una manera por la que el animal aprende a predecir acontecimientos en su medio.

La intensidad o probabilidad de que tenga lugar una respuesta condicionada disminuye si el EC se presenta reiteradamente sin el ENC. Este proceso se conoce como extinción. Si una luz que se ha asociado a alimentos se presenta repetidas veces en ausencia de alimento, dejará progresivamente de provocar salivación. La extinción es un importante mecanismo de adaptación; sería desadaptativo para un animal continuar respondiendo las claves en el medio que ya no son significativas. Las pruebas indican que la extinción no es lo mismo que el olvido, sino que en su lugar se aprende algo nuevo. Además, lo que se aprende no es simplemente que el EC ya no antecede al ENC, sino que el EC ahora indica que no se producirá el ENC.

B) Condicionamiento Operante

El condicionamiento operante implica la asociación entre una conducta específica y el suceso reforzador. Un segundo modelo fundamental del aprendizaje asociativo, planteado por Edgar Thorndike y estudiado sistemáticamente por B.F. Skinner et al., es el condicionamiento operante (también conocido como aprendizaje por ensayo y error). En un ejemplo de laboratorio característico de condicionamiento operante un investigador coloca una rata o una paloma hambrienta en una cámara de exploración en la que el animal es recompensado por una acción específica. Por ejemplo una palanca en la pared. Si el animal recibe pronto un reforzador positivo (p.ej., comida) cuando presiona la palanca, posteriormente presionará ésta más a menudo de lo habitual.

Introducción

Si pensamos en el condicionamiento clásico como en la formación de una relación predictiva entre dos estímulos (el EC y el ENC), el condicionamiento operante puede ser considerado como la formación de una relación predictiva entre un estímulo (p.ej. comida) y un comportamiento (p. ej., presionar la palanca). Al contrario que en el condicionamiento clásico, que examina la tendencia a respuestas reflejas específicas a estímulos seleccionados, el condicionamiento operante afecta a conductas que se producen ya sea espontáneamente o sin un estímulo identificable. Las conductas operantes se dice que son emitidas en lugar de provocadas, cuando una conducta produce cambios favorables en el medio (cuando es recompensada o induce a la separación de un estímulo nocivo), el animal tiende a repetirla. En general las conductas que son recompensadas tienden a ser repetidas, mientras que las conductas que se siguen de consecuencias que producen aversión, no necesariamente dolorosas (castigos o refuerzo negativo), en general, no se repiten. Muchos psicólogos experimentales piensan que esta simple idea, denominada la ley del efecto, gobierna buena parte de la conducta voluntaria.

Las leyes del condicionamiento clásico y el operante son bastante semejantes, lo que sugiere que las dos formas de aprendizaje pueden utilizar los mismos mecanismos nerviosos.

El aprendizaje asociativo no es aleatorio pero está limitado por la biología del organismo, los animales en general aprenden a asociar los estímulos que son importantes para su supervivencia. El cerebro no es una tabla rasa, es capaz de percibir algunos estímulos y no otros. Puede diferenciar algunas relaciones entre las cosas en el medio y no otras. Las presiones de la evolución han predispuesto a los cerebros de diferentes especies a relacionar ciertos estímulos o, en un cierto estímulo y un comportamiento, mucho más fácilmente que otros. Los factores genéticos y los de las experiencias pueden también modificar la eficacia de un reforzador en una especie. Los resultados obtenidos con un tipo particular de reforzador varían enormemente entre las especies y entre los individuos dentro de las especies, en especial en los seres humanos.

C) Condicionamiento clásico del reflejo palpebral

El cerebelo y el núcleo amigdalino participan en ciertas formas de memoria implícita. Las lesiones de varias regiones del cerebro, que son importante para tipos implícitos de aprendizaje, afectan a las respuestas condicionadas clásicas simples. El caso mejor estudiado es el condicionamiento clásico del reflejo palpebral protector en los conejos, una forma específica de aprendizaje motor. Un parpadeo condicionado puede establecerse emparejando un estímulo auditivo con un soplo de aire en el ojo, lo que origina un parpadeo. Richard Thompson y colaboradores observaron que la respuesta condicionada (parpadeo en respuesta a un sonido) puede ser abolida lesionando cualquiera de dos lugares. La lesión en el vermis del cerebelo, incluso una región tan pequeña como 2mm^2 , suprime la respuesta condicionada, pero no afecta a la respuesta no condicionada (parpadeo en respuesta a un soplo de aire). Curiosamente las neuronas en la misma zona del cerebelo muestran un aumento dependiente del aprendizaje en la actividad que va íntimamente paralela al desarrollo de la conducta condicionada.

En segundo lugar, una lesión en el núcleo interpositus, un núcleo cerebeloso profundo, también puede abolir el parpadeo condicionado. Tanto el vermis como los núcleos profundos del cerebelo, desempeñan un importante papel en el condicionamiento del parpadeo y quizá de otras formas simples de condicionamiento clásico en las que participa el movimiento clásico como el movimiento muscular esquelético.

El almacenamiento a corto plazo de la memoria implícita en formas simples de aprendizaje es el resultado de variaciones en la eficacia de la transmisión sináptica. Gran parte de los progresos en el estudio celular del almacenamiento de la memoria procede del examen de formas elementales de aprendizaje, habituación, sensibilización y condicionamiento clásico. Estas modificaciones celulares se han analizado en la conducta de invertebrados simples y en diversos reflejos de vertebrados como los reflejos de flexión, la respuesta de miedo y el parpadeo. Las formas más simples de aprendizaje implícito varían la eficacia de las conexiones sinápticas que constituyen la vía mediadora del comportamiento.

La habituación implica una depresión presináptica de la transmisión sináptica dependiendo de la actividad. En la habituación, la forma más simple de aprendizaje implícito, un animal aprende las propiedades de un estímulo nuevo que resulta inocuo. Un animal responde primero a un estímulo nuevo prestándole atención con una serie de respuestas de orientación. Si el estímulo no es ni beneficioso ni perjudicial, el animal aprende, después de la exposición repetida, a ignorarlo. La habituación fue investigada por primera vez por Ivan Pavlov y Charles Sherrington. Al estudiar la postura y la locomoción, Sherrington observó una disminución de la intensidad de ciertos reflejos, como la retirada de una extremidad, en respuesta a la estimulación repetida. La respuesta refleja sólo retornaba después de muchos segundos de descanso. Sugirió que esta disminución, que denominó habituación, es el resultado de la disminución de la eficacia sináptica en las vías de las neuronas motoras que han sido activadas repetidas veces. Más tarde Alden Spencer y Richard Thompson advirtieron paralelismos celulares y conductuales estrechos entre la habituación del reflejo medular de flexión del gato y la habituación de respuestas conductuales más complejas en seres humanos. Demostraron, a través de registros intracelulares de neuronas motoras medulares en gatos, que la habituación disminuye la fuerza de las conexiones sinápticas entre las interneuronas excitadoras y las neuronas motoras. No estaban afectadas las conexiones entre las neuronas sensitivas que inervan piel y las interneuronas.

El caracol marino *Aplysia californica*, que posee un sistema nervioso simple que solo contiene unas 20000 neuronas centrales, constituye un sistema sencillo excelente para estudiar las formas implícitas de memoria. *Aplysia* posee un repertorio de reflejos defensivos de retirar su branquia y su sifón, un pequeño caño carnosos situado por encima de la branquia que se emplea para expeler agua de mar y desechos. Estos reflejos son similares a los que se emplean en el reflejo de retirada de la pata estudiado por Spencer y Thompson. Por ejemplo, un ligero estímulo táctil en el sifón desencadena la retracción del sifón y la branquia. Con la estimulación repetida, estos reflejos se habitúan. También se pueden sensibilizar y someter a condicionamiento clásico.

La retracción branquial en *Aplysia* se ha estudiado en respuesta a un estímulo táctil novedoso para el sifón, la activación de las neuronas sensitivas que inervan el sifón genera potenciales sinápticos excitadores en interneuronas y células motoras. Los potenciales sinápticos de las neuronas sensitivas y la interneuronas se suman, tanto temporal como espacialmente, para provocar la descarga repetida de las células motoras, lo que provoca la enérgica retracción refleja de la branquia. Si el estímulo se repite, los potenciales monosinápticos excitadores generan también potenciales sinápticos más débiles en las neuronas motoras, con el resultado neto de que la neurona motora se activa mucho menos enérgicamente y la respuesta refleja disminuye. El análisis cuántico reveló que la disminución de la fuerza sináptica es el resultado de un descenso en el número de vesículas de transmisor liberadas de las terminales presinápticas de las neuronas sensitivas. Estas neuronas sensitivas emplean el glutamato como transmisor. El glutamato interacciona con dos tipos de receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) de los vertebrados y otro del tipo no NMDA. Los mecanismos sinápticos que subyacen a la habituación pueden variar de dos maneras. Primero, el lugar de la depresión puede situarse en cualquiera de entre varios lugares de sinapsis, por ejemplo en el reflejo de flexión de la médula espinal no existe depresión de la transmisión sináptica en las conexiones directas que establecen las neuronas sensitivas con las interneuronas, por el contrario, se cree que la depresión se produce en un lugar posterior: en las sinapsis realizadas por ciertas clases de interneuronas sobre las neuronas motoras del reflejo. Segundo, a la habituación pueden contribuir mecanismos diferentes de la depresión homosináptica, como la facilitación de la inhibición sináptica.

La sensibilización implica la facilitación presináptica de la transmisión sináptica. Cuando un animal recibe repetidas veces un estímulo inocuo, aprende a habituarse a él. Por el contrario, con un estímulo nocivo el animal suele aprender a responder más enérgicamente no sólo a ese estímulo, sino también a otros, incluso los inocuos. Los reflejos de defensa de retracción y escape se exaltan. Esta facilitación de las respuestas reflejas, denominada sensibilización es más compleja que la habituación, un estímulo aplicado en una vía produce una variación en la intensidad del reflejo de otra vía. Como la habituación, la

Introducción

sensibilización tiene una forma a corto plazo y otra a largo plazo. Por ello, aunque una descarga única en la cola de un animal produce una sensibilización a corto plazo que dura minutos, la sensibilización producida por cinco descargas o más en la cola dura días o semanas. Un estímulo nocivo en la cola facilita la transmisión sináptica en varias conexiones en el circuito nervioso del reflejo de retracción branquial, incluidas las conexiones que establecen las neuronas sensitivas con las neuronas motoras y las interneuronas, las mismas sinapsis que se deprimen en la habituación. Así, una sinapsis puede participar en más de un tipo de aprendizaje y almacenar más de un tipo de memoria. Sin embargo la habituación y la sensibilización emplean mecanismos celulares diferentes para causar la alteración sináptica. La habituación a corto plazo en *Aplysia* es un proceso homosináptico; el proceso que disminuye la fuerza de la sinapsis es un resultado directo de la actividad de las neuronas sensitivas y sus conexiones centrales en la vía refleja. Por el contrario la sensibilización es un proceso heterosináptico, la facilitación de la fuerza de la sinapsis es inducida por interneuronas reguladoras activadas por estimulación de la cola.

El condicionamiento clásico supone la facilitación de la transmisión sináptica que depende tanto de la actividad de la célula presináptica como de la postsináptica. El condicionamiento clásico es una forma de aprendizaje más compleja que la sensibilización. En lugar de aprender sólo sobre un estímulo, el organismo aprende a asociar un estímulo con otro, un estímulo condicionado inicialmente débil se puede convertir en un productor de respuesta muy eficaz cuando se combina con un estímulo no condicionado fuerte. En reflejos que se pueden facilitar tanto por condicionamiento clásico como por sensibilización, el condicionamiento genera una facilitación mayor y más duradera.

Los reflejos de retracción del sifón y la branquia de *Aplysia* se pueden facilitar tanto por condicionamiento clásico como por sensibilización. El reflejo de retracción branquial puede desencadenarse de una de las dos maneras siguientes, estimulando el sifón o una estructura vecina denominada manto. El sifón y el manto son inervados independientemente por dos poblaciones diferentes de neuronas. Por tanto, cada vía refleja se pueda condicionar de forma independiente emparejando un estímulo condicionado al área adecuada

(el sifón o el manto) con un estímulo no condicionado (una descarga potente en la cola). Después de este entrenamiento emparejado o asociativo, la respuesta de la vía condicionada a la estimulación está considerablemente facilitada en comparación con la vía no emparejada. En el condicionamiento clásico es crucial el momento del estímulo condicionado y no condicionado. El estímulo condicionado debe preceder al estímulo no condicionado, a menudo dentro de un intervalo de 0.5s. En el condicionamiento clásico del reflejo de retracción branquial de *Aplysia* una característica importante es el momento de la convergencia en neuronas sensitivas individuales del estímulo condicionado y el estímulo no condicionado. Como hemos visto, un estímulo no condicionado en la cola activa interneuronas facilitadoras que establecen conexiones axo-axónicas con las terminales presinápticas de las neuronas sensitivas portadoras de la información procedente del sifón y del manto. La facilitación presináptica resultante genera habitualmente la sensibilización conductual. Sin embargo, si el estímulo no condicionado (a la cola) y el estímulo condicionado (al sifón o al manto) se aplican cronológicamente, entonces las interneuronas reguladoras puestas en marcha por el estímulo no condicionado activarán las neuronas sensitivas justo después de que el estímulo condicionado haya activado las neuronas sensitivas. Esta activación secuencial de las neuronas sensitivas durante un intervalo crítico por el EC y el ENC induce a una mayor facilitación presináptica que cuando los dos estímulos no están emparejados apropiadamente, esto se denomina dependencia de actividad.

Existen componentes pre y postsinápticos en la facilitación dependiente de actividad. La actividad en la vía del estímulo condicionado provoca a la entrada de Ca^{2+} en la neurona sensitiva presináptica con cada potencial de acción, y esta entrada activa la calmodulina, una proteína fijadora de Ca^{2+} . El complejo Ca^{2+} / calmodulina activado se une a la adenilciclase, potenciando su respuesta a la serotonina y facilitando su producción de AMPc. Por tanto, el mecanismo celular presináptico del condicionamiento clásico en la vía monosináptica del reflejo de retracción de *Aplysia* es, en parte, una elaboración del mecanismo de sensibilización de esa misma vía. Esto se debe a que la adenilciclase actúa como un detector de coincidencia. Es decir, reconoce la representación molecular tanto del estímulo condicionado (actividad de puntas

Introducción

en la neurona sensitiva y la consiguiente entrada de calcio) y el estímulo no condicionado (liberación de calcio) y el estímulo no condicionado (liberación de serotonina por los estímulos de la cola) y responde tanto al estímulo condicionado (unión a Ca^{2+} / calmodulina activada por la entrada de Ca^{2+} después de los potenciales de acción) como al estímulo no condicionado (unión a Gs activada por la unión de serotonina a un receptor).

El componente postsináptico a la neurona sensitiva. En la vía del reflejo de retracción de *Aplysia* la célula motora postsináptica tiene dos tipos de receptores de glutamato, receptores de tipo no NMDA y de tipo NMDA.

1.2. SISTEMA ADRENÉRGICO

Se denomina de esta manera debido a que las neuronas postganglionares del sistema nervioso autónomo simpático (SNAS) liberan principalmente adrenalina como neurotransmisor u hormona.

La división adrenérgica es la encargada de estimular y movilizar las reservas de energía, y es la parte que se activa en situaciones de estrés. También estimula a las glándulas suprarrenales segregándose adrenalina y noradrenalina al torrente circulatorio. Sin embargo, aunque la adrenalina puede funcionar como neurotransmisor, su papel en el funcionamiento del sistema nervioso central queda completamente relegado por la acción de la noradrenalina. Esta paradoja en el nombre se debe a que la potente producción de adrenalina desde la médula de las glándulas suprarrenales, como consecuencia de la activación simpática, tiene unas consecuencias generalizadas e iguales que las de la acción de la noradrenalina liberada por la neurona postsináptica de una vía autónoma.

1.2.1. Catecolaminas

La noradrenalina, la adrenalina, y la dopamina pertenecen al grupo de los neurotransmisores denominados catecolaminas. Las catecolaminas, secretadas por el sistema nervioso simpático y la médula suprarrenal, participan en la regulación de diversas funciones, en particular para integrar las reacciones a diversos tipos de estrés o tensión, que de otra manera pondrían en peligro los mecanismos homeostáticos (Goodman et al., 1996).

Hay mecanismos reguladores que operan eficientemente para modular la proporción de síntesis de catecolaminas. El factor limitante es la síntesis de DOPA por la *Tirosina hidroxilasa* (TH), primera enzima que participa en la ruta de síntesis de las catecolaminas.

Por otro lado, dos son las enzimas principalmente responsables de la degradación metabólica de las catecolaminas: la monoaminoxidasas (MAO) y la

Introducción

catecol-oxi-metiltransferasa (COMT). La MAO, se encuentra en las células unida a la superficie de la membrana mitocondrial. Es abundante en las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, pero también está presente en muchas otras localizaciones, como el hígado y el epitelio intestinal. La MAO convierte las catecolaminas en sus correspondientes aldehídos, los cuales, en la periferia, son rápidamente metabolizados hasta su correspondiente ácido carboxílico. La MAO es inhibida por varios fármacos, que se utilizan fundamentalmente por sus efectos sobre el sistema nervioso central. Estos fármacos provocan importantes efectos secundarios que están relacionados con alteraciones de la transmisión adrenérgica periférica. En las neuronas simpáticas, la MAO controla el contenido de dopamina y noradrenalina, de manera que el almacenamiento de noradrenalina disponible aumenta cuando se inhibe la enzima. La COMT es una enzima ampliamente distribuida que aparece en tejidos tanto neuronales como no neuronales. Actúa tanto sobre las propias catecolaminas como sobre sus productos desaminados. (Rang et al., 2003).

En nuestro estudio, centrado en el funcionamiento del sistema nervioso central, el neurotransmisor de interés es la noradrenalina (NA). Ésta se sintetiza a nivel de las terminaciones nerviosas de las neuronas adrenérgicas. Se trata de una catecolamina cuya ruta de síntesis comienza a partir del aminoácido tirosina, el cual, mediante la acción de la enzima *tirosina hidroxilasa*, se transforma en la L-DOPA. En este compuesto actúa la *DOPA-descarboxilasa*, formándose así el precursor de la noradrenalina, la dopamina. Sobre ésta actúa la enzima *dopamina- β -hidroxilasa* obteniéndose la noradrenalina (fig. 1.3).

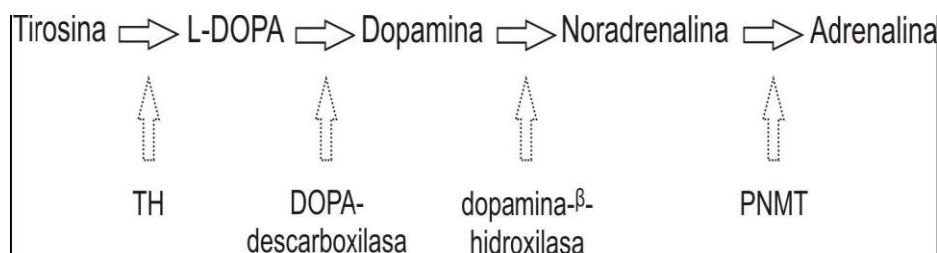


Figura 1.3: Síntesis de catecolaminas

Las catecolaminas se sintetizan en las terminaciones sinápticas a partir del aminoácido tirosina. Por acción de la *tirosina hidroxilasa* (TH) (es la que resulta limitante en el control de la síntesis de los productos siguientes) se obtiene la L-dopa la cual, mediante la *DOPA-descarboxilasa*, se convierte en dopamina (DA), la primera de las catecolaminas. La dopamina, por hidroxilación con la *dopamina-β-hidroxilasa* se transforma en noradrenalina (NA), que es la segunda de las catecolaminas. Finalmente, la NA, por una metilación con la *feniletanolamina N-metiltransferasa* (PNMT), se convierte en adrenalina (A). La mayoría de las reacciones de síntesis que se muestran en esta figura tienen lugar en el axón o en el terminal sináptico. En la ruta de síntesis también se observa, como metabolito intermedio, el neurotransmisor dopamina en cuya ruta de síntesis no se observa la actuación de la enzima dopamina-β-hidroxilasa que es la que interviene en el paso de dopamina a noradrenalina. Esta enzima no se encuentra en las neuronas dopaminérgicas lo que explica que en el sistema nervioso no haya neuronas que puedan sintetizar a la vez dopamina y noradrenalina (Fernández, 18ª Edición).

La noradrenalina se almacena en vesículas y es liberada al espacio sináptico. El mecanismo de acción está regulado por receptores adrenérgicos que pueden estar presentes tanto en la membrana postsináptica como en la presináptica.

1.2.2. Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos son una clase de receptores metabotrópicos asociados a proteínas G, que son activados por las catecolaminas adrenalina y noradrenalina. Éstos se subdividen en receptores alfa (α) y beta (β). Los receptores α -adrenérgicos se subdividen a su vez en α_1 y α_2 . La activación de los receptores α_1 , a través de proteínas Gq aumenta la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular a través del diacilglicerol y del inositol trifosfato. Al ser activados por la noradrenalina tienen una función excitatoria. Los receptores α_2 se unen a proteínas Gi, inhibiendo la adenilato ciclasa y disminuyendo así la concentración intracelular de AMPc. Su función es inhibitoria sobre la neurona en

Introducción

la que se encuentre. Sobre la neurona presináptica, cuando existe NA en el medio, ésta se une al receptor e inhibe a la propia neurona, impidiendo que se libere más NA y disminuyendo así su concentración en el espacio sináptico. Por otro lado, los receptores β -adrenérgicos, los cuales se subdividen a su vez en receptores β_1 , β_2 y β_3 , se unen a proteínas Gs, estimulando la adenilato ciclasa y produciendo así el aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Su función es excitadora.

Los receptores α_1 y β_1 se localizan en los elementos postsinápticos, en la vecindad de las terminaciones nerviosas. Mientras que los receptores α_2 y β_2 se encuentran en las regiones presinápticas y en elementos postsinápticos alejados de los sitios de conexión (que pueden ser estimulados por adrenalina circulante).

Con respecto a los mecanismos de acción de los receptores adrenérgicos, éstos pueden actuar estimulando directamente al receptor (acción directa) o liberar los neurotransmisores de las hendiduras sinápticas (acción indirecta). Incluso pueden actuar de ambas formas (acción mixta). La liberación de NA desempeña un rol neuromodulador en extensas regiones del sistema nervioso central, modulando la actividad de las neuronas.

Los receptores α_1 son receptores postsinápticos y se encuentran en:

A) **Músculo liso** vascular, iris, uréter, pilomotor, útero, trigono vesical, gastrointestinal y esfínteres vesicales. Su acción en el músculo liso es de *constricción* excepto a nivel gastrointestinal donde provocan relajación. En los vasos sanguíneos, coexisten en el sistema venoso y arterial pero predominan en el sistema arterial (así un fármaco agonista α_1 como la metoxamina tiene un efecto predominantemente vasoconstrictor arterial).

B) **Corazón** (nodos SA, AV y ventrículos): efecto crono e inotrópico positivo

C) **Glándulas salivales**: aumento de secreción

D) **Glándulas sudoríparas**: aumento de secreción

E) **Túbulos proximales del riñón**: reabsorción de sodio

F) **Metabolismo:** Aumento de la glicogenolisis, glucogenesis y gluconeogenesis.

Agonistas α_1 : Noradrenalina, Adrenalina, Dopamina, Isoproterenol, Metoxamina

Antagonistas α_1 : Fenoxibenzamina, Fentolamina, Alcaloides ergotamina, Prazozina, Labetalol

Receptores α_2 adrenérgicos:

Se encuentran tanto a nivel presináptico como postsináptico y están presentes en el SNA central y periférico. También están presentes en el SNP, donde ejercen una actividad moduladora del SNP, potenciando los efectos parasimpáticos.

A nivel **periférico** los **receptores α_2 postsinápticos** se localizan en las terminaciones nerviosas adrenérgicas y su estimulación tiene un efecto vasoconstrictor arterial y venoso, tal como sucede con la estimulación de los α_1 postsinápticos; sin embargo su distribución es más importante a nivel venoso, por lo que los fármacos con efecto agonista α_2 o mixto provocan una constricción venosa importante. También se encuentran en las plaquetas, tejido adiposo, páncreas y riñón y los efectos de su estimulación son respectivamente la agregación plaquetaria, la inhibición de la lipólisis, la inhibición de la liberación de insulina y la inhibición de liberación de renina.

La estimulación de los receptores α_2 **postsinápticos** del **sistema nervioso central** está relacionada con la liberación de la hormona de crecimiento e inhibición de la liberación de la hormona antidiurética.

Receptores α_2 presinápticos:

Se encuentran distribuidos a nivel del **sistema nervioso central** (cerebral y medular) y a nivel **periférico** en las terminaciones adrenérgicas. Su estimulación provoca una inhibición de la liberación de noradrenalina en la hendidura sináptica, funcionando como un mecanismo de feed-back negativo, del SNC. Así, la estimulación de estos receptores lleva a una reducción del

Introducción

influjo simpático con un aumento concomitante del parasimpático. Así, la estimulación de estos receptores provoca bradicardia, vasodilatación y efecto inotrópico negativo con disminución del gasto cardíaco e hipotensión. Su bloqueo provoca una vasoconstricción ya que se anula el efecto feed-back negativo de inhibición de liberación de noradrenalina, aumentando de esta forma el efecto adrenérgico. Es bastante probable que sea responsable también, a nivel central de efectos tan importantes en anestesiología como ansiólisis, sedación, analgesia e hipnosis.

La clonidina es un ejemplo de fármaco **agonista** α_2 . Administrada por vía sistémica tiene efectos tanto centrales como periféricos y, administrada por vía intratecal o epidural, puede aumentar de forma espectacular la duración del bloqueo y producir un efecto analgésico aditivo.

Agonistas α_2 : Clonidina, Noradrenalina, Adrenalina, Fenilefrina

Antagonista α_2 : Yohimbina, fentolamina, fenoxibenzamina, labetalol, Idazoxan

Receptores β -adrenérgicos:

Se dividen en dos subtipos principales, β_1 y β_2 .

Receptores β_1 :

Son fundamentalmente postsinápticos y se encuentran en el **miocardio** en el nodo sinoauricular y sistema de conducción ventricular y son estimulados tanto por la adrenalina como por la noradrenalina. Son receptores postsinápticos y su estimulación provoca un efecto crono e inotrópico positivo, bien como aumento de la velocidad de conducción. También se encuentran en el **tejido adiposo** y su estimulación provoca lipólisis.

Agonistas β_1 : Isoproterenol, Adrenalina, Noradrenalina, Dopamina, Dobutamina

Antagonistas β_1 : Acebutolol, Practolol, Propranolol, Metoprolol, Alprenolol, Esmolol.

Receptores β_2 : presinápticos y postsinápticos:

Los receptores **presinápticos** tienen un efecto opuesto a la estimulación de los α_2 aumentando la liberación de noradrenalina endógena en la sinapsis, representando un mecanismo de feed-back positivo del SNS. Los receptores **postsinápticos** se encuentran en el **músculo liso** de los vasos sanguíneos, piel, bronquios, útero, gastrointestinal, vejiga y páncreas. Son más sensibles a la adrenalina que a la noradrenalina. La estimulación de estos receptores provoca **relajación del músculo liso**: vasodilatación, broncodilatación, relajación uterina, etc. Se encuentran también en el páncreas endocrino, estimulando la secreción de insulina y en el hígado donde estimulan la glicogenolisis y la gluconeogénesis; en las glándulas salivares aumentan la secreción de amilasa. A nivel renal están presentes los dos tipos de receptores, predominando los β_1 . El efecto de la estimulación de estos receptores es el aumento de liberación de renina y los beta-bloqueantes inhiben esta liberación. Los β_2 parecen tener un papel en la regulación del flujo sanguíneo renal y su estimulación ocasiona una respuesta vasodilatadora.

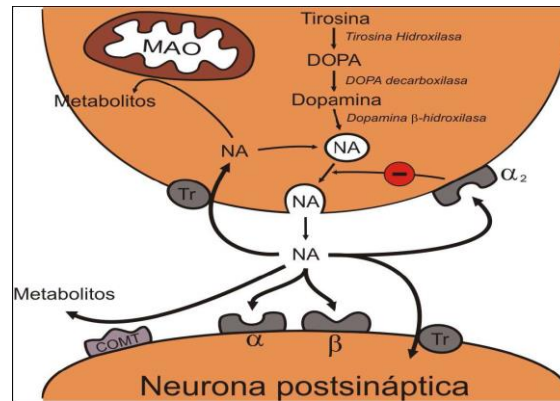


Figura 1.4: Receptores noradrenérgicos

Representación de una sinapsis noradrenérgica. Se muestra la síntesis de noradrenalina (NA), a partir del aminoácido tirosina. La NA se almacena en las vesículas sinápticas, para liberarse, como respuesta a un potencial de acción, por exocitosis de las vesículas; en cada estímulo se libera aproximadamente un 1% de la NA almacenada. Después de su interacción con el receptor, la NA puede eliminarse por distintos mecanismos. La recaptación o transportación por tejido neuronal (captación 1; tr transportador, recaptador) es probablemente el mecanismo más importante, ya que recupera alrededor de un 80% de la NA y constituye una gran fuente de NA para ser reutilizada. Este transporte se realiza contra gradiente, a través de la bomba de protones. Otros mecanismos son la recaptación por el tejido no neuronal (recaptación 2), en el que el neurotransmisor sale de la sinapsis, y el metabolismo, que como sistema de finalizar la acción de la terminal sináptica. La pequeña cantidad de NA que escapa de ser recaptada, entra en la circulación y es metabolizada por la monoamino oxidasa (MAO) y/o por la catecol-o-metil-transferasa (COMT) principalmente en sangre, hígado y riñón. La acción de la NA como neurotransmisor está mediada por los receptores adrenérgicos, que pueden localizarse en la membrana presináptica y/o en la postsináptica. Así, se puede observar que tanto los receptores α_1 y β_1 son postsinápticos, mientras que los receptores noradrenérgicos α_2 se encuentran en el terminal presináptico. Los receptores presinápticos median un sistema de retroalimentación negativo, es decir, cuando son estimulados disminuye la liberación de NA.

1.2.3. Vías noradrenérgicas. El *Locus coeruleus*

Las neuronas encargadas de sintetizar noradrenalina se encuentran en las regiones tegmentales del puente y el bulbo raquídeo. Se dividen en siete núcleos distintos (Flórez, 4^o Edición):

A1: Grupo del bulbo raquídeo ventral. Recibe aferencias de neuronas de la lámina I hasta el asta posterior de la médula espinal. Tiene proyecciones al núcleo parabraquial (Centro apnéustico).

A2: Grupo medular dorsal. Está relacionado con el núcleo del tracto solitario.

A3: Forma parte del núcleo A1.

A4: Forma parte del núcleo A6, correspondiente al Locus coeruleus.

A5: Junto al núcleo A7, forma el Locus subcoeruleus.

A6: Es el centro principal de aporte de noradrenalina en el cerebro. Es el llamado Locus coeruleus.

A7: Forma el Locus subcoeruleus junto con el núcleo A5.

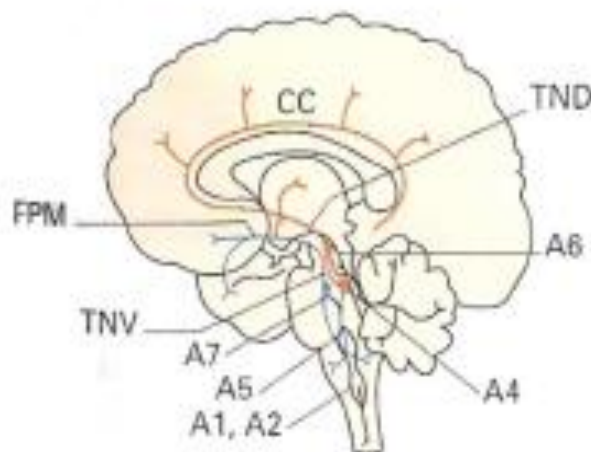


Figura 1.5: Principales núcleos sintetizadores de noradrenalina en el sistema nervioso central

Se representa los distintos centros de síntesis de noradrenalina en el cerebro. Así se puede observar en las regiones tegmentales del puente y el bulbo raquídeo los siete núcleos principales de síntesis de este neurotransmisor. Las áreas A1 y A3 corresponden al grupo del bulbo raquídeo ventral. Estas áreas reciben aferencias de neuronas de la lámina I hasta el asta posterior de la médula espinal. Tiene proyecciones al centro apnéustico. El área A2 es el grupo medular dorsal, el cual está relacionado con el núcleo del tracto solitario. Los núcleos A4 y A6 forman el Locus coeruleus, que es el centro principal de aporte de noradrenalina en el sistema nervioso central. A5 y A7 constituyen el Locus subcoeruleus. A diferencia de las vías dopaminérgicas y adrenérgicas, restringidas a unas áreas cerebrales concretas, las vías noradrenérgicas son más amplias e inervan gran parte del encéfalo. Las neuronas noradrenérgicas están implicadas en procesos como el aprendizaje, respuesta, atención y ansiedad. Dichas neuronas se activan durante situaciones de estrés, aumentando de este modo la liberación terminal de noradrenalina, con lo que se facilita la atención y la vigilancia.

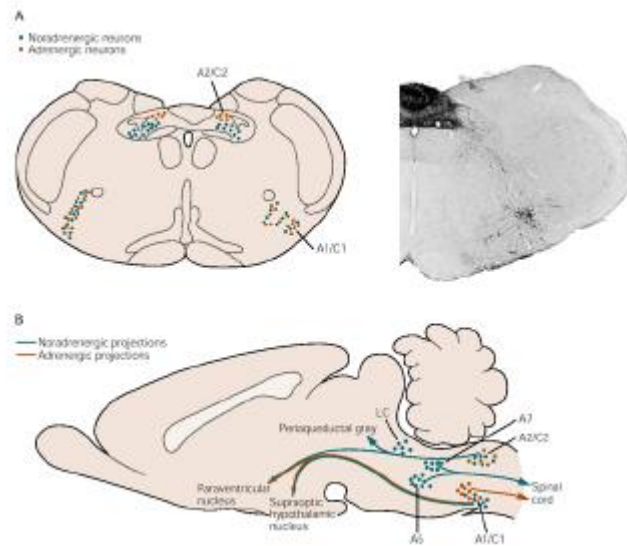


Figura .1.6: Neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas en el bulbo y la protuberancia

(A) Las neuronas catecolaminérgicas en la médula dorsal (centros noradrenérgico A2 y adrenérgicos C2) son parte del núcleo del tracto solitario. Las que están en la médula ventrolateral (el centro noradrenérgico A1 y el adrenérgico C1) se encuentran cerca del núcleo ambiguo. **(B)** La proyección adrenérgica a la médula espinal surge de las neuronas C1, mientras que la proyección noradrenérgica a la médula espinal proviene de los grupos neuronales A5 y A7 (Locus subcoeruleus), así como del Locus coeruleus (LC) (A6) en la protuberancia. La entrada noradrenérgica ascendente al hipotálamo se deriva de los dos grupos neuronales A1 y A2, mientras que la entrada adrenérgica al hipotálamo proviene de las neuronas C1.

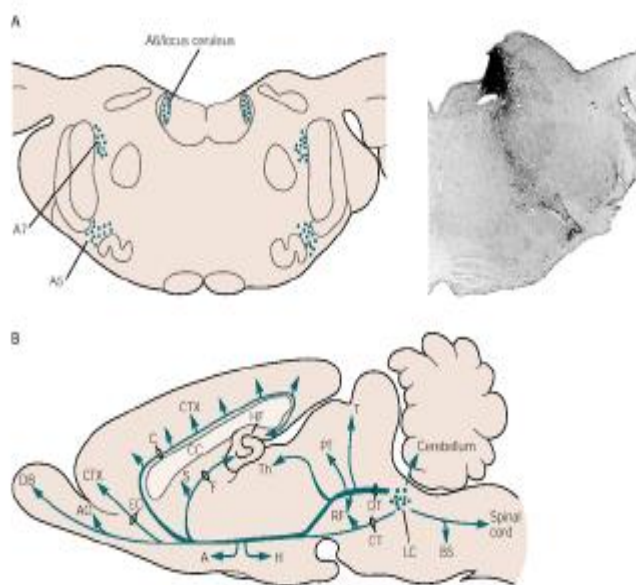


Figura 1.7: Neuronas noradrenérgicas en el puente

(A) Las neuronas noradrenérgicas se distribuyen en el puente en tres grupos diferenciados: el Locus coeruleus (grupo A6) en la sustancia gris periacueductal, el grupo A7, más ventrolateral y el grupo A5, situado a lo largo del margen ventrolateral del pontino tegmental. **(B)** Las neuronas de los grupos A5 y A7 inervan principalmente el tronco cerebral y la médula espinal, mientras que el Locus coeruleus presenta una salida ascendente hacia el tálamo y la corteza cerebral, así como proyecciones descendentes al tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal. A = amígdala; AO = núcleo olfatorio anterior; BS = tallo cerebral; C = haz cingulado; CC = cuerpo calloso; CT = tracto tegmental central; CTX = corteza cerebral; DT = haz dorsal tegmental; EC = cápsula externa; F = fornix; H = hipotálamo; HF = formación del hipocampo; LC = locus coeruleus; OB = bulbo olfatorio; PT = núcleo pretectal; RF = formación reticular; S = septum; T = tectum; Th = tálamo.

Las vías noradrenérgicas se originan de grupos neuronales presentes en el cerebro medio y el bulbo raquídeo y, en función de sus trayectorias, se dividen en un haz ventral y otro dorsal. Éste último parte del Locus coeruleus (LC), que como ya se ha mencionado anteriormente, es el principal aporte de noradrenalina, y constituye la masa más densa y compacta de neuronas noradrenérgicas. Es el origen de todas las aferencias noradrenérgicas al cerebro. Se trata del núcleo noradrenérgico más importante y en él se concentran alrededor de doce mil neuronas noradrenérgicas. El LC está situado en la parte dorsolateral del puente, en el troncoencéfalo, localizado bilateralmente en la protuberancia (región gris central en el puente rostralateral, bajo el IV ventrículo). Sus proyecciones alcanzan muchas áreas en el cerebro

anterior, cerebelo y médula espinal. Esta red le da al LC la capacidad anatómica de integrar la actividad funcional de muchas regiones cerebrales e influir en la función cerebral y su reactividad de forma muy importante. Es el centro crítico de la atención. Las neuronas del LC tienen tanto ramas axonales ascendentes como descendentes.

Las descendentes van a la médula, predominantemente por el cuerno ventral a través del sistema coeruleoespinal, y pueden localizarse en la columna ventrolateral. (Fernández, 18ª Edición). Los tractos descendentes también llegan al mismo tronco del encéfalo, especialmente al núcleo sensitivo del trigémino.

Las proyecciones ascendentes terminan en el diencefalo (ampliamente en el tálamo dorsal, con pequeñas proyecciones terminales en el hipotálamo), cerebelo, base del cerebro anterior (incluyendo el hipocampo, el cual controla el aprendizaje y la memoria a largo plazo), amígdala cerebral y en la corteza prefrontal (que juega un papel predominante en la atención y en la memoria a corto plazo a la hora de realizar tareas motoras complejas en ausencia de los estímulos clave), configurando una extensa red.

El LC, por su parte, recibe aferencias de muchas o posiblemente todas las modalidades sensoriales de la periferia. Las principales aferencias que recibe el LC proceden del núcleo paraventricular (NPV) localizado en el hipotálamo. Su importancia recae en la respuesta hormonal al estrés. Cabe destacar que neuronas del LC son activadas por la hormona *adrenocorticotropa*, u hormona liberadora de corticotropina, (CRH) que media la respuesta a ciertos factores asociados al estrés como puede ser la hipotensión (Valentino y otros, 1993). Existen conexiones recíprocas entre este núcleo paraventricular y el LC que conforma una vía de control hipovolémico. También existen otras aferencias desde varios núcleos del troncoencéfalo como pueden ser el núcleo del rafe dorsal (NRD) y el núcleo del rafe medial (NRM) que lo relacionan con el dolor (revisado en Valenzuela-Harrington, 2007). La vía más importante del dolor es el tracto espinotalámico (STT) que cuando contacta con el LC, lo activa y éste induce una descarga de NA que provoca un aumento de la ansiedad y de la vigilia. El LC también tiene aferencias importantes desde otros dos núcleos del tronco encéfalo, el Núcleo Paragigantocelular (PGi) y el Núcleo Prepositus

Hipoglosi (PrH). Son dos clases de aferencias con sus respectivos grupos de neuronas: aferencias excitatorias que median actividad evocada sensorialmente y aferencias tónicamente inhibitorias según el estado de alerta y la conducta del momento. Posiblemente estas aferencias provengan del núcleo PGI y PrH, respectivamente.

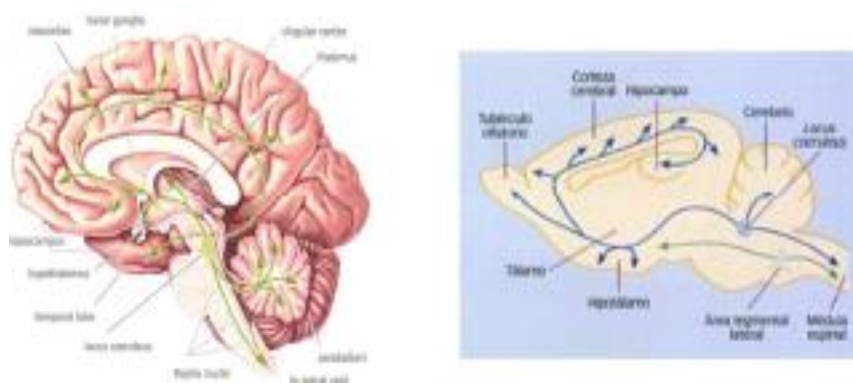


Figura 1.8: Vías noradrenérgicas

Se representa las vías noradrenérgicas con flechas verdes en el cerebro humano de la izquierda y con flechas azules en el cerebro de una rata a la derecha. Se puede observar como las distintas proyecciones que parten del Locus coeruleus alcanzan muchas áreas del cerebro anterior, cerebelo y médula espinal. Esta red le da al LC la capacidad anatómica de integrar la actividad funcional de muchas regiones cerebrales e influir en la función cerebral y su reactividad de forma muy importante.

Algunas de las aferencias del LC lo relacionan con el proceso del *arousal* que puede interpretarse como el paso de sueño profundo a sueño más ligero (Brown et al., 2001; Jones, 2003). Las neuronas del LC poseen una actividad espontánea que varía según el estado del ciclo vigilia-sueño. Estas neuronas presentan la máxima frecuencia de descarga durante la vigilia, disminuye esta frecuencia durante el sueño ligero y haciéndose mínima en el sueño REM. El estudio de la actividad eléctrica de las neuronas del LC sugiere que este silencio durante el sueño REM se debería a la inhibición activa de las neuronas. Esto coincide con los niveles de liberación de noradrenalina medida en la corteza (Aston-Jones, 1981).

En cuanto a procesos de aprendizaje y la memoria también juega un papel clave. Existen proyecciones ascendentes del LC del tracto noradrenérgico

dorsal (TNAD) que ejercen función en la modulación de la atención y memoria. Este TNAD está relacionado con el procesamiento de la información ante una situación nueva o que requiera atención (revisado en Valenzuela 2007). La hiperactividad del LC interrumpe actividades automáticas que son incompatibles con respuestas conductuales que requieren un alto grado de alerta e interacción con estímulos ambientales. La hipo o híper función del LC influye sobre la actividad sensorial y motora, favoreciendo respectivamente a programas conductuales automáticos, o respuestas a estímulos ambientales relevantes. La liberación de noradrenalina por factores de atención, ciclo vigilia o sueño parece ser esencial para el aprendizaje y es responsable de la consolidación de la memoria (Gibbs, 2000).

Debido a la temprana ontogenia del sistema noradrenérgico, también ha llevado a pensar que este sistema ejerce las funciones de regulación en el desarrollo de la corteza. Numerosos estudios han documentado su papel en los procesos de desarrollo y en el mantenimiento de la plasticidad cortical (Blue y Parnavelas, 1982; Bear y Singer, 1986; Lidow y Rakic, 1994; Osterheld-Haas et al., 1994). La fuerte expresión de los receptores adrenérgicos durante la corticogénesis también ha llevado a la hipótesis de que estos receptores están implicados en diferentes procesos de desarrollo, incluyendo la migración neuronal (Wang y Lidow, 1997) (Andrews y Parnavelas, 2012).

1.2.4. Desarrollo pre y postnatal del sistema noradrenérgico

1.2.4.1. Desarrollo embrionario del tronco del encéfalo

El sistema nervioso de los vertebrados se desarrolla a partir del ectodermo, la más externa de las capas del embrión en sus primeras etapas. Aparece como un epitelio columnar engrosado, conocido como placa neural. Al mismo tiempo, la placa neural se pliega para formar una estructura tubular, el tubo neural. A lo largo del tubo neural, se generan tres vesículas cerebrales que dan origen a las tres grandes divisiones del encéfalo: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo. Durante el desarrollo embrionario, el tronco del encéfalo, localizado en el romboencéfalo, aparece subdividido en una serie de segmentos denominados rombómeros (r1-r8), los cuales tienen características

distintas desde el punto de vista molecular. La segmentación del tronco del encéfalo comienza en roedores alrededor del día 7 de gestación (E7) (Lumsden y Krumlauf, 1996) durante el cual, se establece un patrón de expresión de genes del desarrollo. Entre estos genes del desarrollo, se encuentran los genes Hox, los cuales dependen de un gradiente endógeno de ácido retinoico (Gavalas, 2002; Maden, 2002) y de la expresión de otros genes, como Kreisler y Krox20. Los distintos patrones de expresión génica son los que permiten la especialización de los subtipos neuronales, confiriéndoles a las neuronas de los distintos rombómeros propiedades diferentes, confiriéndole así a las células en formación la que será su identidad neuronal definitiva.

Como puede verse en la fig. 1.9, durante el desarrollo embrionario las neuronas noradrenérgicas del romboencéfalo se originan en dos regiones diferentes. Así los rombómeros englobados en el intervalo r5-r8 darán origen a las neuronas noradrenérgicas bulbares y el rombómero 1 dará lugar a las neuronas del Locus coeruleus (White y Schilling, 2008).

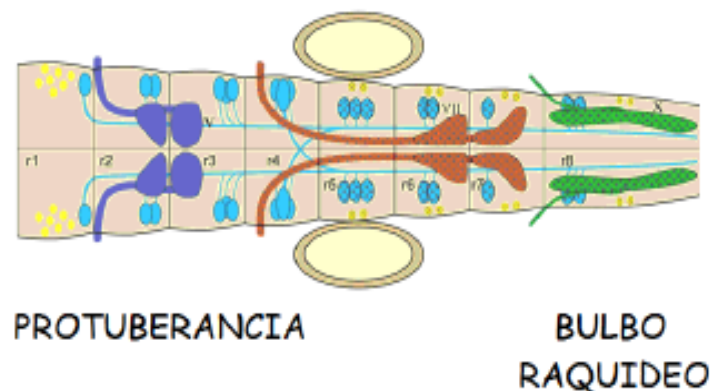


Figura 1.9: Organización segmentaria del romboencéfalo y sus derivados neuronales tempranos

Vista dorsal (anterior a la izquierda) del romboencéfalo tardío, indicando su división en 8 rombómeros (r1 – r8) y los distintos grupos neuronales. En color morado se muestra las neuronas correspondientes al nervio trigémino (V). En naranja se indican las correspondientes al nervio facial (VII). Las neuronas del nervio vago (X) se representan en color verde. Y finalmente, en color amarillo, se muestran las neuronas noradrenérgicas troncoencefálicas. Las neuronas noradrenérgicas localizadas en los rombómeros r5, r6, r7 y r8, darán origen a las neuronas noradrenérgicas bulbares, mientras que las situadas en el rombómero 1 originarán las neuronas del Locus coeruleus. Figura tomada de White y Schilling, 2008.

1.2.4.2. Desarrollo postnatal del sistema noradrenérgico

Durante el desarrollo postnatal se produce una maduración funcional que afecta a numerosas estructuras del tronco del encéfalo. Entre ellas destacamos la maduración del sistema noradrenérgico a nivel del puente.

En esta etapa, crítica para el desarrollo conductual y neuroendocrino, los receptores adrenérgicos α_2 alcanzan los valores máximos de expresión en el tronco del encéfalo (Happe et al., 1999; Iushkova y Dygalo, 1995) y se han propuesto como posibles reguladores de procesos durante el desarrollo (Dygalo et al., 2000; Happe et al., 2004). La manipulación neonatal de dichos receptores en la zona del puente ha demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina et al., 2001; Shishkina et al., 2002; Shishkina et al., 2004).

Según el estudio de Dygalo et al., (2004), la densidad de receptores adrenérgicos α_2 muestra un pico durante la primera semana de vida en ratas. Sin embargo, en la corteza la densidad de estos receptores es menor. En adultos el aumento no se produce y la densidad de estos receptores es mucho menor (Mansouri et al., 2001). Esto permite a distintos agonistas y antagonistas de estos receptores tener efectos específicos en el desarrollo de la estructura cerebral.

Existen distintos fármacos que actúan sobre dichos receptores, actuando como agonistas o antagonistas. Un compuesto agonista de un receptor α_2 es aquel que actúa sobre dicho receptor, activando y estimulando la respuesta del receptor en cuestión, produciendo una disminución en los niveles de AMPc. Siendo éste mayoritariamente presináptico, cabe recordar que el efecto será inhibitorio. Por el contrario, un antagonista α_2 será aquella sustancia que bloquea al receptor, inactivando su función. Uno de los lugares de acción de los receptores α_2 es el Locus coeruleus. Aquí, como hemos mencionado, su efecto es el de controlar la liberación de noradrenalina.

1.2.5. Trastornos neurológicos y psiquiátricos

Las lesiones o el mal funcionamiento del sistema noradrenérgico están implicadas también en diversos trastornos, como pueden ser la epilepsia, el Parkinson, el Alzheimer, la depresión o el estrés. Las lesiones en las neuronas del LC se han implicado en fenómenos de epilepsia y en la enfermedad de Parkinson. La pérdida parcial de neuronas del LC puede explicar la disminución del estado de alerta, la menor reacción a estímulos dolorosos y la alteración del ciclo circadiano de los enfermos de Alzheimer. Por otro lado el LC sería fundamental en gran parte de la respuesta del síndrome de abstinencia. El rol del LC en tal síndrome explicaría la efectividad del uso de clonidina (agonista de receptores α -adrenérgicos) en el tratamiento de la adicción a opiáceos. Se ha demostrado que durante el estrés aumenta la degradación de la noradrenalina en regiones cerebrales tales como la corteza y el hipocampo, para los cuales el LC es la única fuente de NA. Igualmente, la depresión podría asociarse con una hipofunción del LC. A partir de diversos estudios realizados con animales se ha propuesto también al LC como mediador de la ansiedad y sus manifestaciones

Introducción

conductuales. Sin embargo, en experimentos realizados con humanos no se ha llegado a la misma conclusión, por lo que esto sugiere que el LC en humanos, podría ocuparse del control del estado de alerta y aprendizaje y no estar implicado directamente en los fenómenos relacionados con la ansiedad.

1.3. CLONIDINA

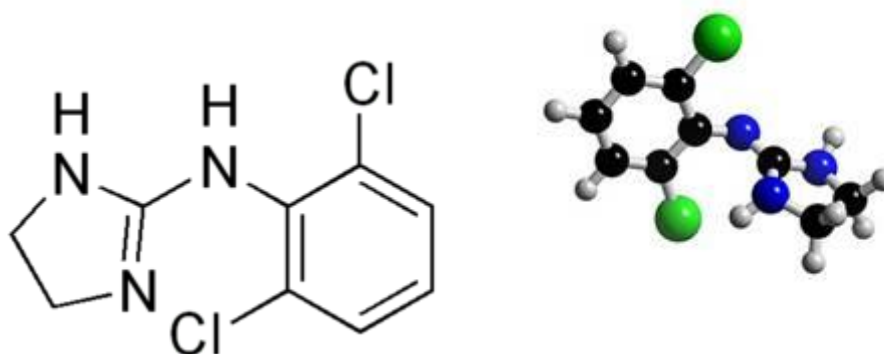


Figura 1.10: Estructura química de la clonidina

1.3.1. Definición

La clonidina es un agonista de los receptores α_2 -adrenérgico. Inhibe la excitabilidad de la neurona originando la disminución de su actividad, reduciendo así la liberación de noradrenalina (NA) en el medio. Actúa sobre el receptor contribuyendo a su función inhibitoria.

El clorhidrato de clonidina es un derivado imidazolinico, químicamente afín a la fentolamina y a la tolazolina, sintetizada en 1962 en Alemania, con el nombre de ST155, con el fin de lograr un nuevo agente descongestivo. Sin embargo, las acciones del mismo fueron principalmente la disminución de la presión arterial, de la frecuencia cardiaca, la sedación y la sequedad de las mucosas. Desde 1966 se usó el ST155 con el nombre de clonidina como agente antihipertensivo.

En distintos estudios realizados, se ha obtenido que la administración aguda de clonidina disminuye la actividad del Locus coeruleus, interrumpiendo la

atención en pruebas difíciles de atención sostenida (revisado por Valenzuela y otros, 2007).

Además de actuar en los receptores α_2 -adrenérgico localizados en el Locus coeruleus, la clonidina actúa también sobre los receptores adrenérgicos α_2 localizados en las neuronas de las astas posteriores de la médula espinal y controlando la función de numerosos órganos corporales.

1.3.2. Metabolismo de la clonidina

La clonidina se absorbe rápidamente tras su administración oral, alcanzando una concentración máxima a los 60-90 minutos. La vida media de eliminación es de 9-12 minutos y un 50% se metaboliza en el hígado. El resto se excreta sin modificar por el riñón.

Debe sus acciones hipotensoras a la capacidad de estimular los receptores α_2 en el hipotálamo. Estos receptores son inhibidores y provocan depresión de los impulsos que vienen desde los centros vasomotores. Cualquier interrupción de las vías desde los centros vasomotores interfiere con esta acción de Agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_2 . Inhibe el flujo simpático central a través de la activación de los receptores adrenérgicos α_2 en el centro vasomotor medular. La clonidina disminuye la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el gasto cardíaco y produce sedación en relación a la dosis. A diferencia de los opiodes, produce menor depresión respiratoria, y a diferencia de las benzodiacepinas no potencia la depresión respiratoria con opiodes. Una estimulación directa y transitoria de los receptores adrenérgicos α_1 periféricos provoca aumento de la presión arterial transitoria. Puede haber hipertensión arterial de rebote si se discontinúa el medicamento abruptamente. La clonidina suprime los síntomas de privación de opiodes por la inhibición simpática central de receptores α_2 . La clonidina actúa sobre los receptores adrenérgicos α_2 localizados en las neuronas de las astas posteriores de la médula espinal. También inhibe la liberación de neurotransmisores nociceptivos como la sustancia P (presináptica) y disminuye la despolarización postsináptica. Estos efectos no son antagonizados por la naloxona, pero sí por los antagonistas α_2 como la fentolamina. Disminuye la respuesta hemodinámica durante la

intubación endotraqueal, reduce los requerimientos de opiodes y anestésicos volátiles, prolonga el efecto de la anestesia regional y mejora la analgesia postoperatoria.

La clonidina potencia el efecto de los opiodes, alcohol, barbitúricos y ansiolíticos, aumenta el efecto presor de la efedrina y disminuye los requerimientos de los agentes inhalados en un 50%. Los efectos antihipertensivos de la clonidina se antagonizan con bloqueadores adrenérgicos α_2 como la fentolamina y tolazolina, y antidepresivos tricíclicos.

1.3.3. Efectos adversos del uso de la clonidina

Los efectos adversos de este medicamento son, en general, frecuentes aunque transitorios y reversibles. El perfil toxicológico de este fármaco es similar al del resto de vasodilatadores. Los efectos adversos más característicos son:

- Frecuentemente (10-25 %): sequedad de boca, mareos, cefalea, somnolencia y estreñimiento.
- Ocasionalmente (1-9 %): hipotensión ortostática, depresión, ansiedad, fatiga, náuseas, anorexia, alteraciones del sueño, reducción de la libido, impotencia, retención o incontinencia urinaria, escozor ocular, prurito y erupciones exantemáticas.
- Raramente (<1 %): bradicardia, bloqueo auriculoventricular, cambios en el ECG, insuficiencia cardíaca, pesadillas, alucinaciones, síndrome de Raynaud y ginecomastia.

1.3.4. Clonidina y Receptores imidazolínicos

En 1984 Bousquet et al., estudiando la relación de estructura/actividad del efecto hipotensor inducido por la inyección directa de clonidina en la región rostral ventrolateral del bulbo, sugirieron que dicho efecto era mediado por otro tipo de receptores diferentes de los adrenérgicos (que no inducían descensos de la presión arterial), mientras que la inyección de imidazolinas o sus análogos siempre producían caídas dosis dependientes de la presión arterial. Así postularon la existencia de receptores específicos para imidazolinas.

Estudios posteriores han demostrado la existencia de sitios específicos para imidazolinas comparado con los sitios α_2 adrenérgicos. Recientemente, De Vos et al., confirmaron que la distribución de los receptores imidazólicos no era idéntica a aquella de los receptores α -adrenérgicos. El análisis de los mecanismos de producción del efecto hipotensor y sedante de drogas del tipo de la clonidina permitió confirmar la existencia de dos tipos funcionalmente diferentes de receptores. Tibirica et al., (1991) demostraron en la rata que el efecto sedante de estas drogas era mediado por la unión a receptores alfa adrenérgicos en el *Locus Coeruleus* mientras que la actividad hipotensora dependía de la unión de estructuras imidazólicas a la zona rostral ventrolateral del bulbo.

1.3.5. Uso de clonidina durante el embarazo o la lactancia

Los estudios en animales mostraron un aumento de las resorciones fetales en ratas a las que se les administró una, dos veces la dosis terapéutica humana durante dos meses antes del apareamiento. La clonidina atraviesa la placenta, alcanzando en el recién nacido concentraciones séricas correspondientes a la mitad de los niveles maternos. No hay estudios adecuados y bien controlados en humanos, aunque se han descrito casos aislados de dismorfogénesis asociados a su uso (tetrafocomelia, labio leporino, hendiduras en el paladar, etc.) El uso de este medicamento sólo se acepta en caso de ausencia de alternativas terapéuticas más seguras.

Por otro lado, la clonidina también pasa a la leche materna en cantidades significativas pero no parece causar ningún efecto en el lactante. Se desconocen los efectos a largo plazo.

Según De Kandel, las drogas de abuso aumentan el nivel de dopamina liberada en el cerebro: Las drogas adictivas, como la cocaína, la anfetamina, los opiáceos y la nicotina, actúan como reforzadores positivos. Los animales oprimirán con facilidad una palanca para autoadministrarse una infusión intravenosa de anfetaminas, por ejemplo. Se puede condicionar a los animales a autoadministrarse directamente drogas adictivas en determinados lugares del cerebro a través de una microcánula. La capacidad de una droga de actuar como

refuerzo positivo que sostiene una conducta en animales de experimentación guarda una estrecha relación con la capacidad de abuso de la droga en los seres humanos. Las drogas de abuso potencian los efectos reforzadores de la estimulación eléctrica del cerebro, disminuyendo la frecuencia de los pulsos de descarga necesarios para producir un determinado nivel de respuesta conductuales. Es como si las drogas facilitara el placer producido por la estimulación eléctrica del cerebro.

Los fármacos que producen refuerzo también aumentan el nivel de dopamina liberada en las terminales de las proyecciones del área tegmentaria ventral. Algunos fármacos lo hacen bloqueando el transportador de dopamina. Así, tanto la cocaína como la anfetamina elevan el nivel de dopamina en el núcleo accumbens bloqueando el transporte de dopamina, prolongando así el tiempo que la dopamina permanece en la hendidura sináptica. El transportador de dopamina puede ser el lugar de acción de la cocaína y la anfetamina, y como tal podría ser un objetivo molecular de fármacos desarrollados para controlar la adicción.

Con el fin de poner a prueba esta idea, Marc Caron y sus colaboradores alteraron el gen que codifica el transportador de dopamina mediante recombinación homóloga en una cepa de ratón de laboratorio. Los ratones homocigotos no mostraban activación de la conducta después de recibir por vía general cocaína o anfetamina, lo que concuerda con la noción de que el transportador es un participante crucial en el mecanismo de acción de anfetamina y cocaína. El estudio de cortes de estriado in vivo reveló que la anfetamina libera dopamina en los ratones naturales pero no en los mutantes.

Aunque muchas de las drogas de abuso regulan la transmisión dopaminérgica, no todas ellas lo hacen a través del transporte de dopamina. La nicotina, posiblemente la droga más adictiva y de la que se basa de forma más generalizada, aumenta el nivel de dopamina en la vía mesocorticolímbica, como la cocaína y la anfetamina. La nicotina favorece la liberación de dopamina actuando sobre los receptores colinérgicos presinápticos. Esta facilitación de la dopamina puede actuar como un refuerzo constante del consumo de cigarrillos. Por el contrario, los agonistas opiáceos *u* no parecen producir recompensa

Introducción

porque inhiben las neuronas GABAérgicas que normalmente suprimen las neuronas dopaminérgicas en el área tegmentaria ventral.

El núcleo accumbens, un objetivo de la acción de estas drogas adictivas, posee dos sectores funcionales: el centro y la cubierta. La cubierta establece poderosas conexiones con el sistema límbico y el hipotálamo, y es especialmente sensible a las drogas adictivas. Así la inyección intravenosa de cocaína, morfina y anfetamina tiene como consecuencia una mayor liberación de dopamina de la cubierta del núcleo.

En la regulación de la autoestimulación de los animales y del placer en el hombre, también participan vías que emplean otros transmisores. De hecho, la estimulación eléctrica del haz medial del procéncéfalo mantiene la autoestimulación activando sólo indirectamente las células dopaminérgicas. Los estímulos eléctricos más eficaces activan un grupo de neuronas no dopaminérgicas en el haz medial del prosencéfalo que se proyectan al mesencéfalo y allí activan las neuronas dopaminérgicas ascendentes. Además, no todas las drogas que crean dependencia requieren el sistema de la dopamina. Por lo menos se puede producir cierto grado de dependencia de opiáceos, alcohol y benzodiacepinas en ausencia de mecanismos dopaminérgicos.

De hecho, la adicción supone más que el refuerzo positivo derivado de una droga y la anticipación resultante de la euforia que produce. Otros dos rasgos caracterizan la adicción, la tolerancia y la dependencia. La tolerancia alude a la progresiva adaptación de la dosis que produce euforia, de forma que son necesarias dosis cada vez mayores para lograr el mismo efecto euforizante. La dependencia se refiere a las consecuencias viscerales de la abstinencia de droga, como las náuseas. Por ello, el abuso de drogas no sólo está impulsado por el efecto de recompensa que producen, sino también por los poderosos efectos aversivos de la abstinencia. La tolerancia puede deberse en parte a la falta de desensibilización inducida por la droga de sistema de refuerzo positivo. De la misma manera, algunos de los síntomas del rebote del sistema de refuerzo dopaminérgico.

1.3.6. Receptores imidazólicos y receptores adrenérgicos y efectos en el desarrollo

Los receptores imidazólicos se distinguen de los receptores adrenérgicos α_2 por su distribución anatómica en el cerebro (Emsberger et al., 1987; Bricca et al., 1989; Wickberg y Uhlen, 1990). Los bloqueantes de los receptores imidazólicos, como la rilmemidina y el idazoxan, protegen frente al daño neuronal en la isquemia global (Gustafson et al., 1989; Gustafson et al., 1990) y en la isquemia cerebral focal (Maiese et al., 1992), según se describe en el libro “Neuroanestesia y cuidados neurointensivos” por Georg E. Cold y Bent L. Dahl. Los receptores imidazólicos están localizados en el puente, en el locus coeruleus, y en el bulbo raquídeo, en el Núcleo Motor Dorsal del Vago, el Núcleo del Tracto Solitario y el Núcleo Reticular Lateral.

Durante el desarrollo postnatal, crítico para el desarrollo conductual y neuroendocrino, los receptores adrenérgicos α_2 alcanzan los valores máximos de expresión en el tronco del encéfalo (Happe et al., 1999; Iushkova y Dygalo, 1995) y se han propuesto como posibles reguladores de procesos durante el desarrollo (Dygalo et al., 2000; Happe et al., 2004). La manipulación neonatal de dichos receptores en la zona del puente ha demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina et al., 2001; Shishkina et al., 2002; Shishkina et al., 2004).

Según Gorter et al., (1990), la reducción neonatal de NA por inyección subcutánea diaria de clonidina conlleva a una hipersensibilidad de NA en las células CA1 del hipocampo, afectando de forma permanente a procesos de plasticidad y en el kindling epileptogénico en adultos.

Igualmente se ha comprobado (Mirmiran et al., 1985) que la clonidina actúa sobre los neurotransmisores de NA, suprimiendo el desarrollo del sueño REM en neonatos de ratas. De adultos, esas ratas tratadas neonatalmente con clonidina muestran hiperactividad, hiperansiedad, reducción de la conducta sexual, trastorno del sueño y reducción del tamaño cortical cerebral.

Por otro lado, según el estudio de Dygalo et al., (2004), la densidad de receptores adrenérgicos α_2 muestra un pico durante la primera semana de vida en ratas. Esto permite a la clonidina tener efectos específicos en el desarrollo de la estructura cerebral. De este modo, la clonidina aumenta el nivel de expresión de la enzima apoptótica caspasa-3 RNAm, medida por RT-PCR e intensifica la fragmentación del ADN. En la corteza de las crías de ocho días, el nivel de los receptores adrenérgicos α_2 es mucho más bajo que en el tronco del encéfalo. No tiene el mismo efecto en el córtex. Con esos datos se sugiere que la clonidina facilita la muerte celular durante el desarrollo cerebral.

“La clonidina puede ser una opción terapéutica aceptable para el control del dolor oncológico severo refractario a altas dosis de opioides y/o con infusión neuraxial de anestésico local (su uso para el manejo del dolor intratable en cáncer fue aprobado por la FDA desde 1996, de 100 y 150 mcg/mL), y que su efecto parece tener mejores resultados en aquellos pacientes con un componente de dolor neuropático significativo. Sin embargo, se necesita mayor cantidad de ensayos clínicos controlados aleatorios evaluando las diferentes vías de administración, para poder establecer conclusiones definitivas”. (Arias Butrago J. et al., Bogotá 2013).

Se diseñó un estudio para evaluar la eficacia y seguridad de la clonidina como medicación preanestésica del paciente hipertenso. Se trataron 50 sujetos hospitalizados para cirugía mayor electiva entre 20 y 65 años de edad, ambos sexos, cifras tensionales en 140/90 o más, clase II de riesgo de la ASA, asignándose aleatoriamente al tratamiento con clonidina o placebo vía oral en un ensayo prospectivo y a doble ciego. Se administró una dosis de 0,075 mg de clonidina 8, 12 y 16 horas antes del proceder quirúrgico. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos respecto a la edad, sexo, valores de tensión sistólica, diastólica, media o pulso radial iniciales. Se evaluaron dichos parámetros cada 6 horas en el pre y posoperatorio. La clonidina disminuyó las cifras tensionales en ambos períodos. Se presentaron reacciones adversas sin importancia clínica en el 27 % de los casos. La somnolencia fue el efecto secundario más común. No se detectaron casos de hipotensión ortostática. El alfa agonista redujo la frecuencia de reacciones

hipertensivas en el período posoperatorio (34 %) comparativamente con el placebo (58 %).

En el estudio se demostró una reducción de los valores tensionales en el preoperatorio y una menor frecuencia de reacciones hipertensivas en el posoperatorio inmediato al administrar clonidina como premedicación, confirmándose lo reportado por otros autores. La peculiaridad del protocolo de ensayo de nuestro grupo radica en la administración oral del alfa agonista 24 horas antes del proceder quirúrgico en dosis fijas intermitentes, lo que condicionó un adecuado control tensional sin riesgos de hipotensión. (Flores González, Julia et al., 1996).

La clonidina se comercializa como un agente antihipertensivo y se ha recomendado como tratamiento para los síndromes de dolor crónico (Bredfeldt 1989), sofocos menopáusicos (Edington 1980; Ginsburg 1985), síndrome de Tourette (Leckman 1985) y abstinencia del abuso de opiáceos o alcohol (Gold 1993; Manhem 1985). Más recientemente, se ha descrito el uso de clonidina como un tratamiento para el abandono del hábito de fumar. Los estudios del síntoma de abstinencia del tabaco a doble ciego informaron de una mejoría del deseo, la ansiedad, la inquietud, la tensión y el hambre gracias al tratamiento con clonidina (Glassman 1984; Gourlay 1994a; Hao 1988; Ornish 1988; Prochazka 1992) aunque otro estudio (Franks 1989) no logró hallar ningún efecto. Estos mismos estudios hallaron que la sedación y otros efectos centrales indeseables acompañan al tratamiento con clonidina.

Una revisión anterior que evaluaba la frecuencia de los efectos adversos (Gourlay 1995) halló que éstos fueron comunes. Entre un 23% y un 92% (media del 71%) de pacientes que tomaron clonidina, en comparación con 4% a 61% (media del 28%) de pacientes que tomaron placebo, describieron algún efecto adverso (EA). Los EA más frecuentes fueron sequedad bucal, sedación y mareos. El 10% de los pacientes que tomaron una dosis de 0,3 mg. informó de hipotensión postural sintomática. El doble de los pacientes que tomaron clonidina interrumpió el fármaco prematuramente debido a experiencias adversas en comparación con los que recibieron placebo (7%).

En conclusión, la clonidina es efectiva para promover el abandono del hábito de fumar. Sin embargo debido a una elevada incidencia de efectos adversos, como la sequedad bucal y la sedación, no es un tratamiento de primera línea. Más bien quizá sea ideal para el subgrupo de fumadores que también se beneficiarían con sus efectos sedativos, por ejemplo los fumadores que tienden a experimentar niveles altos de agitación y ansiedad cuando dejan de fumar. (Gourlay SG, Stead LF, Benowitz NL, 2008).

Uno de los procedimientos usados con animales no humanos para conocer el valor hedónico de las drogas es el condicionamiento de preferencia de plaza (CPP) o de lugar (CL) en el cual se evalúa la preferencia o aversión hacia un contexto asociado previamente con una droga, inferido por el tiempo de permanencia en ese lugar, en comparación con otro asociado a un vehículo (salina). Este trabajo informa sobre distintos aparatos, procedimientos, medidas dependientes utilizadas en el CL y los resultados principales hallados con el uso de etanol. Se presenta un experimento de CL con ratas en el cual se utilizó un diseño intra-intersujeto. Consistió en tres fases: (1) pre-test, preferencia de las ratas hacia dos contextos: lugar negro (LN) y lugar blanco (LB); (2) condicionamiento, cada animal del grupo experimental recibió ensayos alternados de etanol (dosis 0.5 g/kg) asociados al contexto no preferido y solución salina al preferido; los del grupo control, recibieron salina asociado a ambos contextos; (3) post-test igual al pre-test. En ambas pruebas se midió el tiempo de permanencia de las ratas en cada contexto. Los animales tratados con etanol revirtieron la preferencia de lugar, mientras los del grupo salina no la modificaron. De este estudio se infiere que bajo la dosis utilizada, el etanol tiene un valor hedónico positivo. (*Place conditioning in rats and ethanol*. Kamenetzky, Giselle Vanessa et al 2007).

En conjunto, buena parte de la experimentación se ha realizado en humanos en los modelos mencionados y en ratas, posteriormente se han investigado algunos de los efectos a largo plazo de los distintos tratamientos, en el estado adulto. En los primeros estadios sólo se han investigado los efectos sobre el ciclo sueño-vigilia y sobre la actividad general (exploratoria), y siempre en ratas, por ello la presente investigación pretende realizar diferentes pruebas

en ratones adultos de un grupo control y otro grupo tratado postnatalmente con clonidina.

1. 4. ETANOL Y CLONIDINA

1.4.1. Circuito de recompensa cerebral y drogas de abuso

La adicción a drogas de abuso puede ser considerada como una enfermedad del sistema de recompensa cerebral (Vetulani, 2001). Las sustancias de abuso son capaces de modular este circuito, que es fundamental en el inicio y mantenimiento de los comportamientos que son importantes para la supervivencia tales como comer o la actividad sexual. El fascículo telencefálico medial, que conecta el área tegmental ventral con el núcleo accumbens, fueron las primeras estructuras identificadas en este sistema. También están implicadas en el circuito proyecciones procedentes del área tegmental ventral y el núcleo accumbens que inervan otras áreas límbicas (como la amígdala) y corticales del cerebro importantes para la expresión de las emociones, la reacción ante determinados estímulos, y la capacidad para hacer planes y establecer juicios (Tomkins y Sellers, 2001).

Aunque el fascículo telencefálico medial está formado por neuronas que contienen dopamina, serotonina y noradrenalina, es la proyección dopaminérgica la que ha sido clásicamente más implicada en el refuerzo. Así, los refuerzos tanto naturales (comida, sexo) como artificiales (drogas de abuso) activan esta vía (también conocida como “ruta mesocorticolímbica dopaminérgica”), produciéndose entonces un aumento de liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Tomkins y Sellers, 2001). Las neuronas dopaminérgicas son activadas por estímulos que conducen al animal a realizar o repetir un comportamiento determinado (estímulo motivacional) (Di Chiara, 1997). Desde el punto de vista evolutivo, el circuito de recompensa cerebral aumenta la supervivencia porque da prioridad a acciones esenciales para el ser vivo tales como la reproducción o la alimentación; globalmente, este sistema juega un papel esencial en los procesos cognitivos, de refuerzo y motivacionales (Lupica y Riegel, 2005). Sin embargo, las actividades placenteras naturales están controladas por mecanismos de *feedback* que activan los centros aversivos y que ponen fin a esos comportamientos, mientras que esas restricciones no

aparecen en el caso de las drogas de abuso. Existen varios grupos de sustancias que activan el circuito de recompensa y que pueden conducir a la drogodependencia, que en humanos es una enfermedad crónica y recurrente, caracterizada por una pérdida absoluta sobre el control de la droga, y en la que el ansia, el deseo (en inglés, *craving*) del consumo de la sustancia es capaz de inhibir los demás comportamientos (Vetulani, 2001).

A pesar de la gran importancia que juega el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, en los últimos años se ha mostrado que las propiedades agudas reforzantes de varias drogas de abuso son independientes del sistema dopaminérgico, ya que roedores a los que se inactiva este sistema continúan mostrando refuerzo positivo tras la administración de alcohol, heroína y nicotina (Laviolette y Van der Kooy, 2003; Le Moal *et al.*, 1979; Pettit *et al.*, 1984; Rassnick *et al.*, 1993a, b). Actualmente hay consenso en admitir que la adicción, a nivel cerebral, es el producto de desregulaciones progresivas y de múltiples cambios fisiopatológicos en muchas estructuras y sistemas cerebrales, no solo del sistema dopaminérgico mesolímbico. Así, el circuito estriato-palidal-talámico participa en la transición de la motivación a la acción (Kelley, 2004; Mogenson *et al.*, 1980), mientras que la corteza prefrontal tiene un papel importante en la autorregulación del comportamiento y su patología en los problemas de autocontrol (Arnsten y Li, 2005; Dalley *et al.*, 2004; Miller y Cohen, 2001). Por otra parte, un aspecto primordial en la emoción y la motivación depende de la valoración de los estímulos ambientales externos. En esta valoración dependen áreas cerebrales interconectadas como la amígdala, el estriado ventral y la corteza prefrontal (Cardinal *et al.*, 2002). Además, los circuitos cerebrales del estrés están implicados en la vulnerabilidad inicial a las drogas de abuso, el refuerzo negativo asociado con la abstinencia -tanto aguda como tardía y la recaída inducida por estrés (Goeders, 1997; Kreek y Koob, 1998; Piazza *et al.*, 1996; Piazza y Le Moal, 1997, 1998).

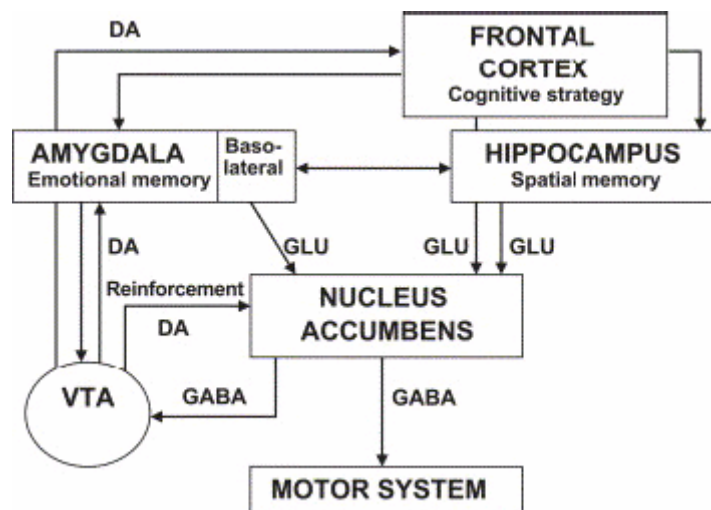


Figura 1.11:

Esquema de las relaciones existentes entre distintas estructuras cerebrales: la corteza frontal, que elabora las estrategias cognitivas de los distintos comportamientos; la amígdala, que procesa las memorias afectivas; el hipocampo, principalmente implicado en la memoria; y el núcleo accumbens y el área tegmental ventral (VTA), reforzando el circuito de recompensa. Nótese que las vías ascendentes son principalmente dopaminérgicas (DA), mientras que las rutas descendentes son mayoritariamente glutamatérgicas (GLU) y GABAérgicas (GABA) (Tomado de De Witte, 2004).

En cuanto a los neurotransmisores implicados en la adicción a drogas de abuso, además de la dopamina, participan también de forma trascendental neurotransmisores como el GABA, la serotonina, la acetilcolina y la noradrenalina (Dachour y De Witte, 2000), neuropéptidos, como el sistema de la pro-opiomelanocortina (POMC) (Wurst *et al.*, 2007) y otros opioides, el factor liberador de corticotropina (CRF), el neuropéptido Y (NPY) (Koob y Le Moal, 2001; Gallate, 2004) o los péptidos CART (*cocaine and amphetamine regulated transcript*) (Domínguez *et al.*, 2004), e incluso hormonas como ghrelina, prolactina, insulina y leptina (Figlewicz *et al.*, 2003, Wurst *et al.*, 2007).

1.4.2. El alcohol como droga de abuso

Dejando aparte la cafeína y la nicotina, el alcohol es, con mucho, la droga legal más comúnmente utilizada. El comportamiento adictivo asociado con el alcoholismo se caracteriza por una preocupación compulsiva por obtener alcohol, la pérdida de control sobre el consumo, y el desarrollo de tolerancia y

dependencia, así como por un deterioro en las relaciones sociales y laborales. Como otros desórdenes adictivos, el alcoholismo lleva asociado una vulnerabilidad crónica a la recaída tras el cese del consumo de alcohol. Los motivos que conducen al consumo excesivo de alcohol en algunos individuos y no en otros son complejos, puesto que responden a las interacciones que se producen entre factores genéticos, psicosociales, ambientales y neurobiológicos (Vetulani, 2001; Weiss y Porrino, 2002; Le Moal y Koob, 2007).

1.4.2.1. Farmacología del alcohol

El alcohol etílico o etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es un líquido claro, incoloro, volátil, inflamable, hidrosoluble y liposoluble, aunque en menor proporción. Respecto a su valor nutritivo, 1 gramo de alcohol aporta al organismo 7,1 Kcal; sin embargo, este aporte energético no se acompaña de un aporte nutritivo, como minerales, proteínas o vitaminas. Aunque el responsable principal de las acciones es el alcohol, otros compuestos que están presentes en las bebidas alcohólicas pueden contribuir a aumentar el daño cuando se bebe en exceso; entre ellos se encuentran alcoholes de bajo peso molecular (metanol, butanol), aldehídos, ésteres, histamina, fenoles, taninos, hierro, plomo y cobalto (Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

El alcohol se obtiene fundamentalmente de la fermentación anaeróbica de los hidratos de carbono, a través de la fermentación alcohólica. Una vez ingerido, aproximadamente el 25% es absorbido en el estómago, y el resto atraviesa las membranas del tracto gastrointestinal por difusión simple. En la velocidad de absorción influyen factores como la presencia de alimentos en el estómago, la cantidad de alcohol ingerida y las características de la bebida consumida. Una vez absorbido, el alcohol se distribuye por todo el organismo, salvo por el tejido graso. El alcohol atraviesa con facilidad las barreras hematoencefálica y placentaria; igualmente puede pasar a la leche materna (Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

Con respecto a su metabolismo, una parte del alcohol ingerido se metaboliza en el estómago, mediante la enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH). Sin embargo, la mayor parte del alcohol absorbido es metabolizado en el hígado,

Introducción

donde sufre dos procesos oxidativos; en el primero, que tiene lugar en el citoplasma del hepatocito mediante la ADH, el etanol pasa a acetaldehído; en el segundo paso el acetaldehído se oxida a acetato. En una menor proporción el alcohol se oxida en los microsomas a través de una vía metabólica específica denominada “sistema oxidativo microsomal para la oxidación del etanol”. Las catalasas localizadas en los peroxisomas constituyen una tercera vía metabólica cuya importancia es escasa o nula.

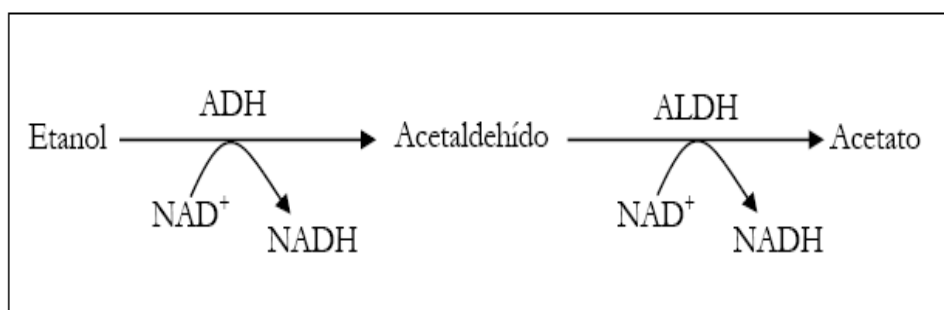


Figura 1.12:

Esquema de la ruta catabólica del alcohol en el hígado. Las consecuencias de la oxidación del alcohol son un incremento en la producción de acetaldehído y un desequilibrio redox, ya que se produce nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) a partir de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+). El segundo paso oxidativo consiste en la formación de acetato a partir del acetaldehído, acción catalizada por una aldehído deshidrogenasa (ALDH) con el concurso también de NAD que se reduce a NADH. Por su parte, el acetato obtenido en el citoplasma del hepatocito es biotransformado en acetil-CoA mediante la acción de la enzima acetilCoA-sintetasa, localizada a nivel mitocondrial (Parés y Caballería, 2002).

Las enzimas ADH y ALDH presentan variantes genéticas, es decir, se han encontrado varios polimorfismos genéticos que son expresados de manera diferente en los distintos grupos raciales. Así, en algunos estudios étnicos se ha observado que un 40% de los orientales poseen formas (isozimas) de ADH más funcionales, es decir, capaces de catabolizar el etanol de forma más rápida, lo que lleva consigo mayores y más rápidas acumulaciones de acetaldehído. El acetaldehído es tóxico, por lo que en estas personas produce un efecto aversivo,

evitando que el sujeto beba en exceso. De este hecho se podría desprender que la forma inactiva de la ADH tendría un efecto disuasorio del consumo de alcohol (Thomasson *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997; Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

1.4.2.2. Efectos del alcohol en la fisiología humana

El etanol es tóxico para la mayoría de tejidos del organismo. Su consumo crónico y excesivo se ha asociado no solo al desarrollo del síndrome de dependencia al alcohol, sino también a numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden acabar con la vida de los sujetos que las sufren. El paradigma de las lesiones orgánicas producidas por el consumo crónico de etanol es la cirrosis hepática. La mayoría de las lesiones hepáticas por alcohol suelen iniciarse en forma de esteatosis hepática, para progresar posteriormente a una hepatitis alcohólica, una cirrosis hepática e incluso un carcinoma primitivo de hígado. De todos modos, las enfermedades producidas por el consumo crónico de alcohol afectan a casi todos los tejidos y sistemas del organismo. Así, tiene efectos graves sobre el sistema cardiovascular (miocardiopatía alcohólica), páncreas (pancreatitis aguda y crónica), sistema nervioso central (atrofia cerebral y cerebelosa, encefalopatías), nervios periféricos (polineuropatía alcohólica), sistema músculo-esquelético (osteoporosis, miopatía alcohólica) y sobre el feto (síndrome alcohólico fetal). También pueden aparecer, como consecuencia del consumo excesivo crónico de alcohol, enfermedades psicoorgánicas (amnesia lacunar, demencia alcohólica), trastornos psicóticos u otras enfermedades psiquiátricas como ansiedad y depresión. El desarrollo de estas lesiones depende en gran medida de la cantidad de alcohol consumido por los pacientes (dosis total acumulada de alcohol durante toda la vida del sujeto), aunque también influye una cierta predisposición personal (vulnerabilidad genética) y/o el concurso de determinadas circunstancias ambientales como malnutrición o infecciones concomitantes, como, por ejemplo, las producidas por los virus de la hepatitis B y C (Estruch, 2002).

1.4.3. Efectos del alcohol sobre el sistema nervioso central (SNC)

1.4.3.1. Mecanismos de acción a nivel molecular del alcohol

A diferencia de las demás sustancias de abuso, el alcohol no ejerce sus efectos psicotrópicos a través de su unión a un receptor específico, sino que es capaz de modificar, a nivel de la membrana neuronal, la permeabilidad de algunos canales iónicos y la funcionalidad de determinados receptores particularmente sensibles a la acción del alcohol. Los efectos psicotrópicos percibidos tras el consumo de alcohol resultan por tanto de la suma de estas acciones (Colombo, 1997).

El etanol es una droga débil; se necesitan decenas de gramos para producir un efecto farmacológico (en contra de lo que ocurre con la mayoría de las drogas de abuso, que actúan en el cuerpo a dosis de miligramos o microgramos por kilogramo). Su molécula no posee un carbono asimétrico, por lo que, como ya se ha mencionado, su interacción con los sustratos biológicos no es estereoselectiva. La complejidad y multitud de efectos que produce el etanol contrasta paradójicamente con la simplicidad de su estructura química. El grupo hidroxilo forma un dipolo en la molécula que favorece la formación de puentes de hidrógeno (o la ruptura de otros ya existentes) con proteínas o con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana. Es la formación de puentes de hidrógeno lo que hace a la molécula soluble en agua en todas las proporciones, y lo que la hace capaz de modificar la organización de moléculas acuosas en la matriz extracelular, pudiendo alterar de este modo la solubilidad de ligandos o iones que interaccionan con receptores de membrana. El etanol, además, es capaz de producir una perturbación de la arquitectura de la membrana por la alteración del orden o la composición de los lípidos situados dentro de la bicapa lipídica, o por la modificación de la estructura de los fosfolípidos dentro del microdominio proteína-lípido que mantiene la arquitectura de la proteína. Por el contrario, aunque el etanol puede localizarse también sobre la superficie externa de la membrana e interaccionar con las cabezas polares de los fosfolípidos, este tipo de interacciones producen pequeños efectos y solamente ocurren a altas concentraciones de alcohol (>100 mM). En cualquier caso, la alteración de la fluidez de la membrana neuronal que produce el etanol no parece ser

responsable de los efectos más significativos de esta droga, ya que no sirve para explicar las acciones etílicas más características, como la intoxicación etílica, los *blackouts* (pérdidas de memoria prolongadas durante las borracheras), gran parte de la tolerancia y la hiperexcitabilidad característica del síndrome de abstinencia (Ayesta, 2002). Sin embargo, sí que parecen ser mucho más importantes las interacciones con la estructura aminoacídica de las proteínas, que ocurren a concentraciones más bajas de alcohol (10-50 mM), y que se producen dentro de los “bolsillos hidrofóbicos” situados en los dominios agua-proteína. Estos sitios pueden encontrarse cerca de la interfase agua-lípido, como ocurre con los receptores para GABA de tipo A (GABAA), pueden también situarse en alguna zona del poro del receptor por donde pasan los iones, como ocurre en el caso del receptor NMDA, o por último, pueden localizarse en sitios de modulación alostérica del receptor, en el dominio extracelular amino terminal, donde se encuentre el sitio de reconocimiento del ligando endógeno, como ocurre en el caso del receptor para acetilcolina (Fadda y Rossetti, 1998).

Como se ve, los efectos farmacológicos del etanol son, por una parte, no selectivos, puesto que se pueden ver afectadas no solo la organización de la membrana y la función de las enzimas ligadas a ella, sino también la de las enzimas y proteínas implicadas en la transducción de señales, de canales iónicos, ionóforos acoplados a receptores y proteínas transportadoras, al igual que también se puede ver afectada la expresión génica. Sin embargo, por otra parte los efectos del etanol se pueden también considerar como específicos, puesto que la molécula interacciona con sitios discretos de cada proteína en particular, que son críticos para la función de la proteína y el funcionamiento celular (Fadda y Rossetti, 1998).

Por tanto, el etanol es capaz de influenciar la función de la mayoría, si no todos, los sistemas neuronales, a nivel molecular, celular, y sistémico. Debido a la reversibilidad de la interacción entre el etanol y las moléculas biológicas, las alteraciones en la función cerebral asociadas con el consumo crónico de alcohol son el resultado de las modificaciones plásticas (adaptativas) que tienen lugar en el cerebro en respuesta a los efectos del etanol, más que del efecto directo de la droga sobre un sustrato particular. Estos cambios pueden ser de corta o larga

duración, pero reversibles, o bien ser permanentes y asociados a procesos degenerativos en determinadas áreas cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Una de las cuestiones más relevantes que se plantea al estudiar las modificaciones provocadas por el alcohol a tan distintos niveles es si el etanol actúa directamente sobre los neurotransmisores y sus receptores, o si ejerce sus acciones indirectamente, alterando el fino equilibrio de neurotransmisión en el cerebro. El cerebro es una red de sistemas de neurotransmisión, y la mayoría de los neurotransmisores están ligados a los demás ya sea porque comparten una misma ruta metabólica (como es el caso del GABA y el glutamato) o bien por sus conexiones neuronales (por ejemplo, GABA-glutamato-dopamina); también porque comparten, en muchos casos, proteínas G y otras rutas de señalización a nivel de los mecanismos moleculares a los que están acoplados sus receptores. Todos estos sistemas actúan siempre en equilibrio, de modo que si un sistema se altera, el desequilibrio aparecerá en todos los demás.

1.4.4. Abstinencia de Alcohol y relación con la clonidina

El acetaldehído, un producto del metabolismo del etanol, parece combinarse con ciertas proteínas comportándose como un falso neurotransmisor que interfiere en el estímulo excitador del SNC motivando la supresión crónica de la misma. En respuesta, el cerebro aumenta la síntesis de neurotransmisores como la norepinefrina, serotonina y dopamina. Esto explicaría la clínica del síndrome de abstinencia alcohólica en el que predominarían los efectos adrenérgicos centrales produciendo síntomas característicos como delirium, alucinaciones, midriasis, temblor, convulsiones, taquicardia, hipertensión e hiperventilación.

En este sentido se han detectado niveles elevados de catecolaminas y sus metabolitos en plasma y orina durante el síndrome de abstinencia. La medición directa de la norepinefrina central y sus metabolitos durante el síndrome de abstinencia alcohólica muestra una elevación de niveles directamente relacionada con su gravedad. También se ha demostrado un aumento en los niveles de dopamina y su metabolito el ácido homovalínico.

El alcohol disminuye la actividad del locus coeruleus donde los α_2 receptores han demostrado su relación con la dependencia alcohólica revertida experimentalmente con Yohimbina (α_2 antagonista) y con éxito terapéutico en el síndrome de abstinencia con clonidina (α_2 agonista).

La hipomagnesemia y alcalosis respiratoria, ambos asociados con irritabilidad tanto central como periférica también podría contribuir a explicar ciertos síntomas asociados al síndrome en cuestión.

El síndrome de abstinencia alcohólica, de forma típica se desarrolla en pacientes que ingieren alcohol diariamente al menos en los últimos 3 meses o han ingerido grandes dosis en las últimas semanas. El síndrome aparece entre las 8-12h y desaparece con una nueva ingesta.

La gravedad del mismo parece ser dosisdependiente. El delirium tremens es la expresión clínica más grave del síndrome de abstinencia alcohólica suele ocurrir a las 72-96 horas de la abstinencia de la bebida. Se produce en el 5% de los alcohólicos. Incluye síntomas precoces con el hallazgo de la alteración profunda del sensorio. Muchos casos desarrollan delirium tremens tras una convulsión. Puede acompañarse de una expresión neurovegetativa autonómica grave.

Los factores de riesgo para padecerlo son: enfermedades concurrentes, historia previa de delirium, antecedentes de convulsiones por abstinencia y la mayor frecuencia y cantidad de ingestión de alcohol. Los síntomas suelen remitir en 3-5 días. La mortalidad sin tratamiento oscila entre 10-15%.

La literatura especializada conceptualiza este cuadro, según el DSM-IV dentro del apartado de los trastornos inducidos por sustancias, se define el síndrome de abstinencia sobre la base de tres criterios:

1. Presencia de un síndrome específico de una sustancia debido al cese o reducción de su consumo prolongado y en grandes cantidades.

Introducción

2. El síndrome específico de la sustancia causa un malestar clínicamente significativo o un deterioro de la actividad laboral y social o en otras áreas importantes de la actividad del individuo.
3. Los síntomas no se deben a una enfermedad médica y no se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental.

Según el CIE-10, se describe el síndrome de abstinencia como:

1. El síndrome de abstinencia en uno de los indicadores del síndrome de dependencia, por lo que este diagnóstico también debe ser tomado en consideración.
2. El diagnóstico de síndrome de abstinencia debe tener prioridad si es el motivo de la consulta y si tiene una gravedad suficiente como para requerir por sí mismo atención médica.
3. Los síntomas somáticos varían de acuerdo con la sustancia consumida. Los trastornos psicológicos (por ejemplo, ansiedad, depresión o trastornos del sueño) son también rasgos frecuentes de la abstinencia. Es característico que los enfermos cuenten que los síntomas del síndrome de abstinencia desaparecen cuando vuelven a consumir la sustancia.

Entendiendo que este tipo de cuadros continuara presentándose de manera frecuente en los servicios de clínica médica y de salud mental, consideramos que es necesario tener un conocimiento acabado y pautas claras de abordaje en su terapéutica. Esto se traducirá en un manejo homogéneo por parte del personal de salud en lo que respecta al paciente, a la tranquilidad del equipo de enfermería y a las respuestas para la familia del paciente con sus demandas.

1.4.4.1. Tratamiento del Síndrome de abstinencia por alcohol:

Se deberá atender los problemas médicos asociados que puedan requerir una atención prioritaria inicial, esto puede ser convulsiones, paro cardiorrespiratorio, politraumatismos, etcétera.

La abstinencia alcohólica empieza tras unas horas después de la interrupción o la reducción del consumo alcohólico intenso y prolongado. Los síntomas máximos ocurren entre las 24 y 48 horas después del último consumo de alcohol. Es necesaria la intervención precoz con fármacos sustitutivos, que presentan tolerancia cruzada con el alcohol ya que si no se actúa sobre este cuadro puede aparecer el delirium tremens en el que existe una marcada hiperactividad autónoma asociada a fenómenos alucinatorios vívidos (insectos o animales pequeños), terror y agitación intensa. Es frecuente la presencia de fiebre y de convulsiones, este cuadro es una urgencia médica que debe recibir tratamiento urgente. En general el paciente que presenta un síndrome de abstinencia menor no presenta estado de deshidratación por lo que el tratamiento ambulatorio y por vía oral es el más recomendado.

Se le debe administrar tiamina 100 mg día, también ácido fólico 1 mg día, asociar una benzodiacepina con el fin de prevenir convulsiones, tranquilizar al paciente y disminuir los síntomas neurovegetativos, en general utilizamos diazepam 10 mg cada 6 u 8 horas e hidratación abundante, se pueden utilizar otras benzodiacepinas como el lorazepam 2 mg cada 6 hs, este último se recomienda porque no tiene pasaje hepático. En el caso que los síntomas neurovegetativos sean muy acentuados (taquicardia, hipertensión y ansiedad) se puede asociar un betabloqueante como propranolol 10 mg cada 6 u 8 horas, o atenolol 50 mg cada 12 horas. Se puede administrar también clonidina 0,1- 0,2 V.O. para combatir la descarga adrenérgica central.

En el caso que el paciente presente agitación psicomotriz con síntomas neurovegetativos acentuados se opta por la internación donde se utiliza la vía parenteral comenzando con un plan de solución fisiológica de 1000 cc más 20 mg de diazepam, más tiamina 100mg (pueden ser disueltos en el suero o vía oral) más 1 ampolla de vitamina C (ac. Ascórbico) en tubuladura, más complejo B6 y B12. Este esquema se administra durante 12 horas seguidas y luego se intercala con 1000 cc de solución con dextrosa 5% más 20 mg diazepam, más 2 amp. vit. B1, B6, B12, pasar en 12 hs, de esta forma también se trata la hipoglucemia (recordar que siempre se debe administrar tiamina antes que la

Introducción

glucosa debido a que la entrada en la célula es más lenta que esta última que es casi inmediata).

En estos pacientes también asociamos carbamacepina 200 a 400 mg como antirrecurrential V.O. Se administra también sulfato de magnesio V.O.

El delirium tremens es el síndrome de abstinencia grave, en su grado máximo para su tratamiento se debe colocar al paciente en una habitación tranquila y bien iluminada. Si está muy agitado es mejor sujetarlo a la cama para evitar que se lesione o que agreda a sus cuidadores.

La reposición hídrica debe ser mayor que lo habitual ya que el paciente se encuentra deshidratado y con déficit de vitaminas, minerales y electrolitos, suele requerir de 2-4 litros de suero al día (en ocasiones puede llegar a ser necesario hasta 8 litros). Se comienza con 2.000-4000 ml de suero fisiológico más tiamina 100 mg mas reposición de potasio, magnesio y fósforo, mas 1 mg de ácido fólico, 20 mg de diazepam, ácido ascórbico, 5 o 10 mg haloperidol.

Se coloca todo en el suero y se pasa en un término de 12 hs. Si hubiere necesidad de mayor sedación se puede dar más benzodiazepinas V.O. Intercalar con suero glucosado al 5% 2000-4000 ml mas potasio, magnesio y fósforo, 1mg de ácido fólico, 10-20mg diazepam, ácido ascórbico, haloperidol 5 o 10 mg. Se coloca todo en el suero y se pasa en 12 hs. Los neurolépticos tipo butirofenonas (haloperidol) logran sedación en el paciente agitado, sin alteración de la permeabilidad de la vía aérea. Respecto a la disminución del umbral epileptógeno por estos fármacos hay opiniones contradictorias; si el paciente lo tolera y remite los síntomas psicóticos y de agitación. El sulfato de magnesio, deficitario en el paciente alcohólico, puede jugar su papel en el tratamiento de las convulsiones y arritmias.

Posteriormente a superar el síndrome de abstinencia se instaura con el paciente un tratamiento integral con un equipo interdisciplinario con abordaje psicoeducativo, psicoterapéutico y eventualmente psicofarmacológico para abordar su alcoholismo. (Esteban Dávila et al., 2008)

A este respecto, el objeto general de nuestro trabajo consiste en reafirmar la importancia de la maduración postnatal del sistema alfa-adrenérgico, evaluando los efectos comportamentales y cognitivos en el ratón adulto tras la administración crónica, en sus dos primeras semanas de vida, del fármaco clonidina. El ratón modelo clonidina, que presenta una reducción del tamaño cerebral y deficiencias contrastadas en corteza e hipocampo, será idóneo para investigar si los ratones adultos tratados postnatalmente con clonidina manifiestan, al igual que los déficits descritos previamente en ratas, algún efecto sobre las respuestas reflejas, sobre capacidad de aprendizaje en tareas que impliquen la presentación asociada de estímulos y sobre conductas que impliquen la ingesta de etanol o el efecto de sustancias y drogas que impliquen refuerzo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente estudio consiste en investigar la importancia de la maduración postnatal del sistema alfa-adrenérgico sobre el desarrollo del aprendizaje asociativo y la conducta en ratones adultos, después de someter a tratamiento diario (crónico) a los sujetos, con un agonista del sistema α_2 adrenérgico (Clonidina) durante las dos primeras semanas de vida postnatal.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Reafirmar la importancia de la maduración postnatal del sistema alfa-adrenérgico en las respuestas de sensibilidad y motoras en los ratones adultos. (Se evaluará mediante pruebas nociceptivas como el Hot-Plate y motoras exploratorias como en el campo abierto (actímetro) y el efecto sobre el sistema auditivo en la respuesta de sobresalto).
- Estudiar, *in vivo*, las posibles modificaciones en la adquisición de respuestas condicionadas en los ratones tratados postnatalmente con clonidina. (Para ello usaremos la técnica del condicionamiento clásico y la Evitación Pasiva).
- Determinar el efecto del tratamiento postnatal con clonidina sobre el desarrollo y la comunicación neuronal de los procesos atencionales durante las tareas de aprendizaje y memoria. (Mediante la prueba de reconocimiento de objetos, startle-inhibición por prepulso y condicionamiento de preferencia de plaza).
- Estudiar el comportamiento social de los sujetos de estudio después del daño producido por el fármaco en el sistema alfa-adrenérgico. (Mediante el test del intruso y el condicionamiento de preferencia de plaza).

Objetivos

- Finalmente estudiar la dependencia o nivel de adicción de los ratones clonidina al consumir etanol durante 20 días.

3. METODOLOGÍA

3.1. SUJETOS EXPERIMENTALES

Para el presente proyecto se han utilizado ratones de la cepa CD-1 clonidina machos y hembras, tanto los sujetos control (WT, n=36, procedentes de tres camadas), que para la presente investigación lo denominaremos como *wild tipe* (WT); como los ratones tratados con Clonidina (Clo, n=53, procedentes de cinco camadas), los cuales, en el momento de las pruebas, tenían entre 4 y 6 meses de edad y pesaban entre 28 - 35 gramos. Los animales procedían del animalario del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Sevilla, España.

Durante una semana, desde la recepción de los animales hasta el momento de las pruebas, no se realizó ningún experimento en los animales. Esto se hizo con el fin de que se habituaran a las condiciones del animalario del edificio de Servicios Centrales de Investigación (SCI), donde se realizaron los experimentos.

3.2 CARACTERIZACION DEL FENOTIPO MOTOR COMPORTAMENTAL EN RATONES ADULTOS

Durante el periodo de habituación y experimentación, cada animal permaneció en una jaula individual de dimensiones 6,5 × 9 × 5,5, cm, sometidos a un ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad y en unas condiciones constantes de temperatura ($21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad ($50\% \pm 7\%$) y ventilación. La comida y bebida estuvieron disponibles *adlibitum*.

El primer grupo fue el de los ratones silvestres (WT), que se usaron como control del experimento; el siguiente fue el de los clonidina. Todos ellos estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales desde su nacimiento hasta la realización de las pruebas. El tratamiento con el fármaco clonidina (Sigma) se realizó, cada día, a una dosis de 35 µg/Kg, por vía subcutánea, durante el período postnatal (P1 – P20).

Los estudios fisiológicos y de comportamiento realizados, se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (2003/65/CE) y de España (BOE 252/34367-91, 2005) para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos. Los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético local de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla, España).



Figura 3.1: Sujetos experimentales (Laboratorio de Neurociencias UPO)

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñó una batería de pruebas destinadas a medir las respuestas sensitivas, motoras-reflejas, cognitivas y sociales-comportamentales de los ratones tanto silvestres (WT), como los tratados postnatalmente con clonidina (CLO) CD1, con una edad comprendida entre los cuatro y seis meses. Las pruebas y técnicas científicas, se habían usado en investigaciones anteriores (Porrás y otros, 2005; Calvo-Núñez y Domínguez del Toro, 2014).

Para medir la analgesia (sensibilidad al dolor) se utilizó la técnica de Hot-Plate. Las habilidades y respuestas motoras se evaluaron mediante las pruebas de Actímetro e Inhibición por prepulso y las capacidades cognitivas (atención, memoria y aprendizaje), se evaluaron por la técnica de reconocimiento de objetos, evitación pasiva, condicionamiento del reflejo palpebral, inhibición por prepulso y condicionamiento por preferencia de plaza. Además, durante la investigación, se aplicó la pruebas para medir comportamiento social y respuesta social mediante el Test del Intruso y la Prueba de consumo de etanol, en ésta última se observa la dependencia en los ratones clonidina (CLO) en relación al alcohol.

3.3.1. Analgesia (test de la placa caliente) ó Hot-Plate

El método de la placa caliente (Accublock, Digital dry bath; Labnet), la cual tiene paredes de metacrilato (10,5 x 16,5 x 14 cm) que impiden al animal escapar de la zona de calor. El animal se introdujo de forma individual, en la placa una vez que ésta alcanzó la temperatura de 52,2°C, según se describe en Mas-Nieto y otros, (2005). El tiempo máximo de permanencia en la placa fue de 240 segundos para evitar daños en el tejido del animal. Una vez superado este tiempo, el animal fue retirado a su jaula.

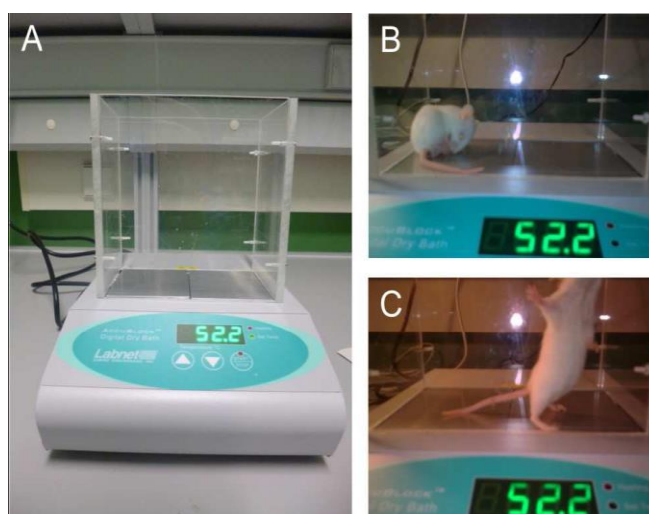


Figura 3.2: Prueba de Analgesia: Variables de la placa caliente

(A) Fotografía de la placa caliente utilizada en el experimento. Se puede observar las paredes de metacrilato que impedían que el animal saliese de la zona caliente. Los bloques se calentaron hasta alcanzar una temperatura de 52,2 °C. (B) Representación de un animal lamiéndose las patas por primera vez (umbral doloroso, T1). (C) Imagen de un ratón alzándose y apoyando sus patas delanteras sobre la pared de metacrilato. Al repetir este comportamiento tres veces, se consideró una conducta de escape (T2), retirándolo de la placa y completando así la prueba. Nótese como la placa caliente permaneció a una temperatura constante de 52,2 °C.

Los ratones realizaron esta prueba por primera vez. Se analizaron dos parámetros, la sensibilidad (T1) y la respuesta comportamental al dolor (T2)

La sensibilidad o umbral doloroso (T1) corresponde con el tiempo, medido en segundos, que emplearon los animales en lamerse las patas por primera vez (fig. 3.2^B). El tiempo máximo en mostrar esta respuesta fue de 15 segundos, anotando este valor a aquellos animales que tardaron un tiempo mayor o no mostraron la respuesta

La respuesta comportamental al dolor (T2), representó la latencia, medida en segundos, que el animal empleó en intentar escapar de la placa caliente alzándose tres veces sobre las paredes de metacrilato, apoyando las dos patas delanteras, o dando un salto. Anotando este valor, como en el caso anterior, a aquellos animales que tardaron más en escapar o no lo intentaron. (Fig. 3.2^C).

3.3.2. Prueba motora: actímetro

La prueba del actímetro supone una medida de la capacidad exploratoria o de la actividad motora general. El actímetro (Cibertec, S.A.), constó de una jaula de metacrilato (35 x 35 x 25 cm.) rodeado de un bastidor con haces infrarrojos en los ejes horizontales X e Y (16 x 16) (ver fig. 3.3^A y 3.3^B). Cuando los animales cortaban estos rayos, mandaban información de la actividad y la localización bidimensional. Esta información fue cuantificada por un programa informático específico (MUX_XYZ16L), mostrando la actividad por minuto (número de haces cortado por minuto) para cada sujeto experimental.

En la realización de esta prueba, se introdujo el animal durante 10 minutos en el actímetro, registrándose así su actividad. Pasado este tiempo se devolvió a su jaula. En ambos grupos, los ratones realizaron la prueba del actímetro por primera vez. A partir del programa informático MUX_XYZ16L, se registró la actividad de los animales durante los 10 minutos de duración de la prueba. Se realizó un registro acumulativo de la actividad exploratoria de los animales. Para ello, se analizó el número de haces infrarrojos cortados por los sujetos experimentales a los 2, 4, 5, 6, 8 y 10 minutos de la realización de la prueba. Además, a partir del mismo programa, también se analizó el tiempo, en porcentaje, que el animal permaneció en el centro del espacio con respecto al total del tiempo activo para observar ansiedad generalizada. (Ver fig. 3.3^D).

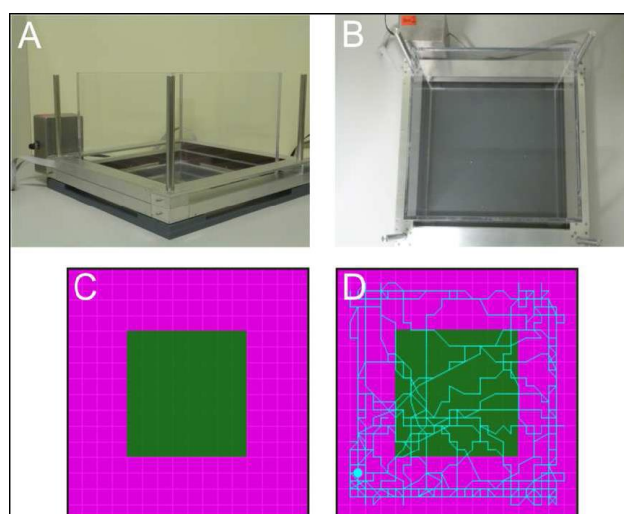


Figura 3.3: Actímetro. (A) y (B)

Imágenes con distintas perspectivas del aparato del actímetro. **(C)** Imagen obtenida del programa MUX_XYZ16L (Cibertec, S.A.). El color rosa muestra la periferia del actímetro frente al centro de éste representado en color verde. **(D)** Imagen similar a la anterior, en la que además del centro y la periferia, se muestra en azul el recorrido efectuado por el animal durante 5 minutos de realización de la prueba.

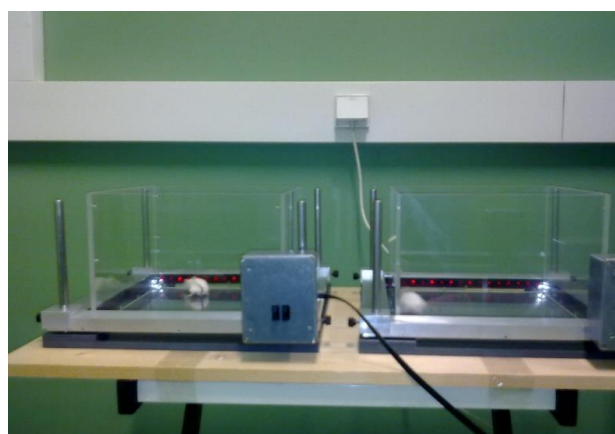


Figura 3.4: Actímetro en pleno experimento

De esta manera se estudia si existen anomalías en el sistema motor y se puede concluir si los animales son híper- o hipoactivos.

3.3.3. RELACIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO Y EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO

3.3.3.1. Prueba de sobresalto e inhibición por pre-pulso (IPP)

El reflejo de sobresalto (o startle reflex) consiste en una respuesta sensoriomotora que se caracteriza por la contracción de los músculos de los ojos (parpadear), el cuello y las extremidades ante un estímulo acústico fuerte e imprevisto. Se considera una respuesta de protección rápida, con una latencia baja.

La respuesta de sobresalto se mide usando un acelerómetro piezoeléctrico controlado por una computadora. La señal convertida a digital se promedió a partir de 25-30 grabaciones.

Una típica sesión de la grabación fue organizada como sigue: El ratón fue colocado dentro del compartimiento (Cibertec, S.A., modelo REST 141) del susto por un período de aclimatación de línea de fondo de 3 min. Las respuestas (basales) se promediaron después de la presentación de 20 sonidos (125 DB, ms 100 de largo). Durante el ensayo de la inhibición del prepulso, el mismo estímulo de 125-dB (100 ms) fue precedida (250ms antes) por un estímulo (prepulso) de 85 dB y 50 ms de largo. Dicho ensayo incluyó estímulos del prepulso aleatoriamente presentados con los estímulos normales del susto (Startle); siendo el total final de 25:25 (v. Borrell et al., 2002). Esta prueba se realizó, de forma individual, en los ratones adultos clonidina y silvestre y tuvo una duración aproximada de 45 minutos por animal.

Los movimientos por el reflejo de sobresalto tras cada estímulo acústico fueron recogidos y se analizaron dos de sus parámetros, latencia de respuesta e intensidad de respuesta. La latencia de respuesta es el tiempo (en segundos) que tarda el ratón en reaccionar tras emitirse el sonido y la intensidad de la respuesta es la fuerza que ejerce el ratón sobre la superficie al provocarle el reflejo de sobresalto con el estímulo acústico (se mide en newton/cm).



Figura 3.5: Inhibición por prepulso

(A) Representación general del aparato de la inhibición por prepulso. Nótese como la cámara estaba colocada dentro de un armario, aislándolo así del ruido exterior. (B) y (C) Imágenes de la cámara con más detalles. (D) Descripción de los pasos seguidos para la realización de la prueba. Cada sesión duró un total de 45 min., de los cuales los 3 primeros fueron de adaptación a la cámara. A continuación, se administraron 30 pulsos (125 dB, 100 ms) para calcular la línea base. 30 s después, el animal recibió 50 ensayos aleatorios, de los cuales 25 fueron pulsos aislados (225 dB, 100 ms) y otros 25 fueron pares de pulsos, esto es, con el pulso ya indicado (125 dB, 100 ms) precedido de otro de menor intensidad y duración (85 dB, 50 ms) para calcular la inhibición por prepulso. Todos los estímulos se separaron con un intervalo de 30 s. La sesión finalizó con 2 min. de reposo.



Figura 3.6: Medida del reflejo de sobresalto acústico en la cámara cerrada

Los 20 primeros pulsos administrados al comienzo de la prueba establecen la *Línea Base* de cada animal y los parámetros que arroja el software nos dan una idea de si la respuesta de sobresalto es distinta entre los grupos experimentales. Estos parámetros son: la latencia de respuesta (VMLR), la latencia al pico máximo (VMLP), el valor del pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA). Para evaluar la magnitud de la respuesta de sobresalto de cada uno de los grupos experimentales en el momento inicial, se midió el valor al pico máximo (VMP) y el valor de la latencia de respuesta (VMLR) en la línea base. A partir de los 50 pulsos siguientes demás, en esta prueba se grabaron y se cuantificaron los mismos parámetros: latencia de respuesta (VMLR), la latencia al pico máximo (VMLP), el valor del pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA).

El porcentaje de inhibición por prepulso, destinados a cuantificar cuánto se modifica la respuesta de sobresalto cuando viene precedida del prepulso, se obtuvo, tomando los VMP, según la siguiente fórmula matemática (López-Ramos y otros, 2010):

$$IPP = \frac{\text{Startle/Prepulsio}}{\text{Línea base}} \times 100$$

Donde Startle es la media de los valores obtenidos durante los 25 pulsos de 125 dB y 100 ms de duración, administrados aleatoriamente durante 25 minutos, para cada uno de los animales de los distintos grupos experimentales. Prepulso es el valor correspondiente a la media de los datos obtenidos durante los 25 pulsos del ensayo de inhibición por prepulso (25 estímulos con pulsos de 125 dB y 100 ms de duración, precedidas en 250 ms por un pulso de 85 dB y 50 ms de duración). Y Línea base, corresponde a los valores obtenidos durante los 20 primeros pulsos administrados al comienzo de la prueba.

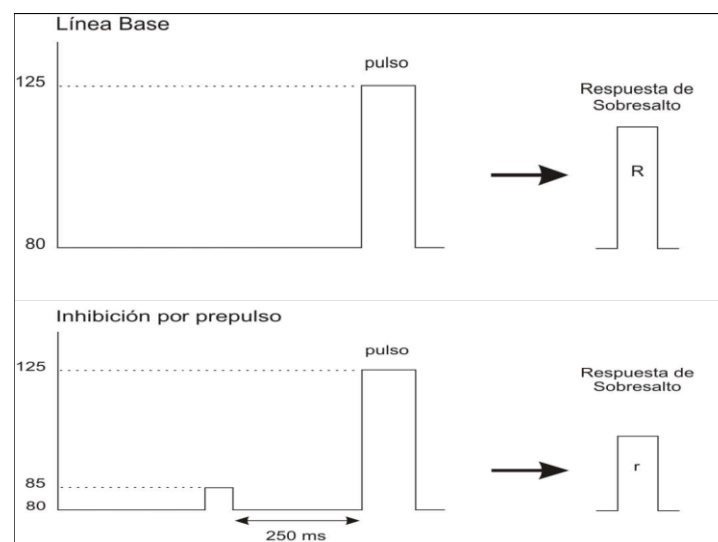


Figura 3.7: Análisis de la inhibición por prepulso

Ilustración de la respuesta de sobresalto (R) producida por un pulso de 125 dB, 100 ms, y de la inhibición que se genera en esta respuesta tras administrar previamente otro pulso de menor tamaño (85 dB, 50 ms), originando una respuesta de menor tamaño (r).

3.3.3.2. Reconocimiento de objetos

La prueba se realizó en una jaula de metacrilato (40 x 25 x 20 cm.), en las que se colocó al animal de forma individual. La caja estaba separada de otras por barreras de cartón, para impedir así cualquier contacto visual entre jaulas. Todas las sesiones fueron grabadas desde arriba por una cámara de vídeo (Sony, modelo DCR-SR36E). Se introdujo a los animales en la cámara de experimentación de metacrilato durante 5 minutos. Fue un periodo inicial de habituación a la jaula. En este tiempo se evaluó su capacidad exploratoria y la actividad en general. Transcurrido el periodo de aclimatación, se colocaron dos objetos #1 y #2, los cuales eran del mismo tamaño, material y forma. Fue la sesión de entrenamiento que duró 5 minutos, al igual que la sesión anterior.

Pasada una hora, se evaluó la memoria a corto plazo (MCP). Para ello, se volvió a colocar al animal en la jaula de metacrilato durante 5 minutos. En esta sesión, se colocó uno de los objetos utilizados en la sesión de entrenamiento #1, que fue el objeto conocido, y un nuevo objeto, #3. El objeto novedoso era del mismo material que el primer objeto, pero varió en la forma. Transcurridas 24 horas, con el fin de medir la memoria a largo plazo (MLP), se volvió a repetir la prueba. En esta sesión el objeto conocido (#1) se mantuvo de nuevo, y se volvió a cambiar el novedoso por otro distinto a las anteriores sesiones (#4) (ver fig. 3.8).

Tras la realización de cada una de las sesiones de la prueba, la jaula y los objetos fueron lavados con etanol al 70% para evitar reconocimiento de olores. Todos los objetos utilizados en la prueba de Reconocimiento de objetos se habían validado en pruebas anteriores, comprobando que los animales no tenían preferencia por ninguno de ellos. Los animales adultos pasaron por todas las sesiones que constituyeron la prueba de Reconocimiento de objetos (habituaación, entrenamiento, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo). Los ratones realizaron la prueba del Reconocimiento de objetos por primera vez.

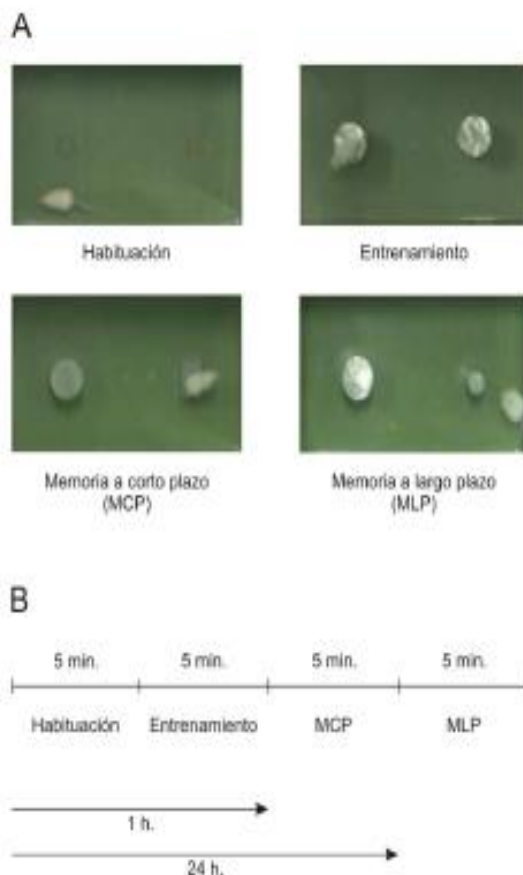


Figura 3.8: Reconocimiento de objetos

(A) Representación de las 4 sesiones de la prueba de *Reconocimiento de objetos*. Nótese como uno de los objetos presentado en la fase de entrenamiento, se identificó como conocido, siendo éste siempre el que permaneció en las distintas sesiones que se dieron a continuación. **(B)** Esquema temporal de la sucesión de las distintas fases experimentales. La primera sesión fue la de habituación, en la que se puso el animal en la jaula en ausencia de objetos. A continuación se colocó dos objetos iguales, fue la fase de entrenamiento. Pasada una hora se analizó la memoria a corto plazo. En esta sesión, se dejó el objeto conocido y se cambió uno de ellos por un objeto nuevo. Al día siguiente, a las 24 horas, se evaluó la memoria a largo plazo. Para ello, se volvió a cambiar el objeto novedoso por otro nuevo completamente, dejando en la caja también el objeto conocido. Todas las sesiones experimentales tuvieron una duración de 5 min.

Para el análisis de los datos de la prueba de *Reconocimiento de objetos*, se estableció un índice al que se denominó índice de exploración (IE) (Dornelles et al., 2007). El coeficiente se calculó según la siguiente expresión matemática:

$$I_E = \frac{C_2}{C_1 + C_2}$$

donde C_2 es el número de contactos que el animal realizó con el objeto novedoso y C_1 los contactos realizados con el objeto conocido. $C_1 + C_2$ es el número total de contactos realizados por el ratón en la sesión estudiada. Si $C_2 > C_1$ entonces, $0,5 < I_E < 1$, lo que significa que el ratón exploró un mayor número de veces el objeto novedoso que el objeto conocido. Este resultado se dio como positivo en las sesiones de memoria a corto y a largo plazo. Si $C_2 = C_1$ entonces, $I_E = 0,5$ por lo que el animal exploró los dos objetos un mismo número de veces. Este resultado se debe obtener en la fase de entrenamiento y en las pruebas de validación de los objetos, demostrando que no existió preferencia por ninguno de ellos. Si $C_2 < C_1$ entonces, $0,5 > I_E > 0$, que indica que el ratón exploró durante más tiempo el objeto conocido frente al novedoso, demostrando así neofobia.

3.3.3.3. Evitación pasiva

Consta de una sesión de entrenamiento y la aplicación de los test. Se estudió si la aplicación de un estímulo aversivo tenía algún efecto en los animales clonidina y silvestres adultos. Para ello se realizó la prueba de la *Evitación pasiva* (Ugo Basile, modelo 7551). Esta prueba consistió en una cámara de metacrilato dividida en dos partes iguales. En la mitad izquierda dicho habitáculo tenía las paredes opacas y oscuras, con ausencia completa de luz. La mitad derecha estaba iluminada y las paredes eran de color blanco semiopacas. Ambas mitades estaban comunicadas por una puerta, la cual se cerraba una vez que el ratón pasaba del compartimento iluminado al oscuro (fig. 3.9).

Día 1: Sesión de entrenamiento

Se coloca al animal en oscuridad al menos durante 5 minutos, luego se le traslada a la cámara blanca, se enciende la luz de la caja y se activa el sistema (apertura de la puerta y encendido del crono). Se observa el comportamiento del

animal en la cámara blanca hasta que se pase a la cámara negra. Una luz roja indica el momento en el que el ratón recibe el choque eléctrico (2.5 mA, durante 2 segundos). Se deja al animal unos 10 segundos en la cámara negra, se anota la latencia y se retira al animal.

Día 1: Test 1 Hora (memoria corto plazo)

Se deja de nuevo al animal en oscuridad durante 5 minutos y se repiten todos los pasos anteriores con excepción del choque eléctrico. El tiempo de corte es de 3 minutos.

Día 2: Test 24 Horas (memoria largo plazo)

El procedimiento es el mismo que el día de entrenamiento, y de nuevo no recibe ningún choque eléctrico al pasar a la cámara negra. El tiempo de corte es de 3 minutos.

Para establecer las posibles deficiencias en la memoria y el aprendizaje se realizó una batería de pruebas relacionadas.



Figura 3.9: Evitación pasiva

Imágenes del aparato de la evitación pasiva en dos perspectivas distintas. Se observa los dos compartimentos diferenciados, el iluminado en color blanco y el que permaneció en la oscuridad, de color negro. En la fotografía de la izquierda se muestra, a la derecha, el pedal que marcaba el inicio de la prueba.

3.3.3.4. Condicionamiento del Reflejo Palpebral

Una de las tareas de aprendizaje asociativo o Pavloviano más utilizadas es el condicionamiento clásico palpebral. En esta prueba de tipo óculo-motora, se pretende que el animal de experimentación aprenda a asociar dos estímulos, estímulo condicionado (EC) y el estímulo incondicionado (EI). El EI es siempre más intenso que el EC y provoca una respuesta refleja de cierre del párpado que se denomina respuesta incondicionada (RI). El EC funciona como "aviso" ante la llegada del estímulo fuerte. Después de varias sesiones, el animal debe aprender a anticipar la respuesta del cierre del párpado a la llegada del EI. Esa será la respuesta condicionada.

Para llevar a cabo este experimento se precisa de una cirugía previa así como la elaboración de electrodos de registro y de estimulación.

3.3.3.4.1. Cirugía

Elaboración de electrodos de registro y de estimulación. Se cuantificará la actividad electromiográfica del músculo ipsilateral del párpado *orbicularis oculi*, mediante dos electrodos de registro. También son insertados dos electrodos de estimulación en la rama supraorbitaria del nervio trigémino izquierdo. Para ello son anestesiados, vía intraperitoneal (i.p.), con una mezcla de Ketamina, (10mg/kg) y xylacina, (1 mg/kg), con una aplicación de 10 ml por 10 g de animal. Los electrodos periféricos utilizados, tanto los de registro como de estimulación, eran de alambre de acero inoxidable y recubiertos de teflón, de 50 µm de diámetro y 2,5 cm de longitud (*A-M Systems, Carlsborg, WA-98324, USA*). En los extremos de los electrodos se quita la cubierta de teflón en 0,5mm, un lado para facilitar la soldadura y el paso de corriente y el extremo contrario se dobla en forma de punta de flecha (anzuelo) para permitir que la inserción tanto en el músculo del párpado superior como en el nervio sean estables. Los electrodos se sueldan por su extremo libre a un conector hembra de 4 vías (*RS-Amidata, Madrid, España*). Los puntos de soldadura son recubiertos por una capa de esmalte con el fin de aislarlos. Tras la inserción en músculo y nervio, el conector se fija al cráneo mediante dos pequeños tornillos 102. Materiales y métodos de

acero inoxidable de 0,8 x 3 mm (*Nuorishi optical S-11*) y cemento dental (Duralay®) (Domínguez del Toro y otros, 2004; Gruart et al., 2006).

3.3.3.4.2. Procedimiento quirúrgico común para implantación de electrodos periféricos

La preparación quirúrgica de los animales para el registro de la actividad eléctrica del músculo *orbicularis oculi* del párpado izquierdo se lleva a cabo en un solo tiempo operatorio, de aproximadamente una hora de duración. Cinco minutos antes de la operación, los animales son anestesiados, vía intraperitoneal, con una mezcla de Ketamina, (Ketolar®) y xylacina, (Rompún®). Durante toda la intervención quirúrgica, se procura mantener estable la temperatura del animal, con una manta de reacción térmica de 10 x 12,5 (*Heat wave 4 W pts1028*) así como mantener la asepsia de la zona de trabajo y el material quirúrgico. Debido a que la instrumentación es reutilizable, se higienizan antes de su uso con esterilizador de calor seco (ref-2432 *QuiruMED*), autoclave de vapor, (140° *Vacuklav 30-B, MELAG*), desinfectante veterinario F10SC, alcohol 70°, dependiendo del nivel crítico (UNE-EN 46003:2000), y con el fin de proteger la córnea de la luz directa durante la operación, se le administra al animal unas gotas humectantes en los ojos (Methocel® 2 %).

Los pasos seguidos son los siguientes:

- Una vez logrado el nivel adecuado de anestesia, se afeita la parte superior de la cabeza del animal y se coloca en un aparato estereotáxico de ratón (Kopf®), con el fin de inmovilizarle la cabeza.
- Se realiza una incisión en la cabeza antero-posterior a lo largo de la línea media que comprende piel y tejido celular subcutáneo.
- Posteriormente, se limpia la zona craneal expuesta con gasas estériles y se les retira el periostio con bisturí y/o espátula. Se hizo hemostasia con cera quirúrgica (*Ethicon®, Johnson - Johnson. Intl, Bélgica*) en los puntos sangrantes.
- Para sujetar el conector al cráneo, se marcaron (pintado) los lugares de anclaje de dos tornillos (*Nuorishi optical S-11*).

- Con un taladro y, sin llegar a la duramadre, se hace un agujero en el hemisferio derecho del hueso frontal y otro en el hemisferio izquierdo del hueso parietal.
- Se colocan los tornillos de anclaje y se aseguran al cráneo mediante cianocrilato (*FORCH*) y cemento dental (*Duralay®*).
- Partiendo del extremo rostral de la incisión, se abre un trayecto subcutáneo hasta el borde libre del párpado superior izquierdo para insertar los cuatro electrodos, soldados previamente a una torreta hembra de cuatro vías.
- Los dos electrodos de registro se implantaron en el músculo *orbicularis oculi* del párpado izquierdo y los dos electrodos de estimulación en la rama supraorbitaria del nervio trigémino del mismo párpado.
- El conector se colocó en la superficie del cráneo delimitada por los dos tornillos de anclaje y se fijó mediante cemento dental y cianocrilato.
- Los extremos, rostral y caudal, de la incisión se suturaron con hilo de seda 4/0 tratando de aproximar lo máximo posible los bordes libres de la herida al conector mediante puntos simples.

Una vez finalizada la cirugía, se lava la zona con un antiséptico (tintura de yodo) y se aplica una pomada cicatrizante con extracto de centella asiática (*Blastoestimulina®*) en los bordes de la herida alrededor del conector.

Los animales despiertan de la anestesia en un máximo de 2 horas de la operación y a las 24 horas muestran un comportamiento normal. Antes de comenzar el proceso experimental, se permite una recuperación postoperatoria de 3 días.

3.3.3.4.3. Respuesta reflejas palpebrales

Se pueden provocar las respuestas reflejas palpebrales aplicando un estímulo (sonoro, eléctrico, etc.). Si se utiliza un estímulo eléctrico, como en nuestro caso, se han descrito dos componentes para esta respuesta (Kugelberg, 1952): R1 y R2.

El componente temprano, R1, recorre el trigémino y mediante una motoneurona facial vuelve al músculo *orbicularis oculis*. Suele aparecer a los 6-8 ms. R2 es el componente tardío. Se le denomina así porque al atravesar la Formación Reticular, no aparece hasta los 14-16 ms. (fig. 3.10).

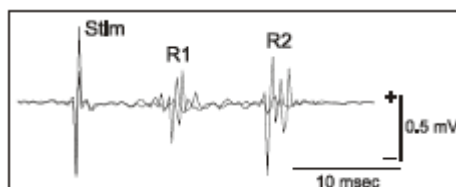


Figura 3.10

Representación de un registro electromiográfico (EMG), donde aparecen los dos componentes de las respuestas reflejas palpebrales a un choque eléctrico.

3.3.3.4.4. Técnica de Registro

Para registrar la actividad electromiográfica del músculo *orbicularis oculi* se utilizan amplificadores diferenciales GRASS P511, con un ancho de banda de 1 Hz a 10 KHz (Grass-Telefactor, West Warwick, RI 02893 USA.). El animal se coloca en una pequeña caja de plástico (5 x 5 x 10 cm). Esta caja se coloca dentro de una caja de Faraday de mayor tamaño (30 x 30 x 20 cm). Se somete a todos los grupos a dos sesiones de habituación, ocho de condicionamiento y cuatro de extinción, durante 14 días consecutivos a la misma hora. En la habituación, sólo se le administra al ratón el primer estímulo (EC) hasta un total de 60, separados cada 30 ± 5 segundos, y con la intención de que el ratón se adapte a la nueva situación (lugar del experimento, EC, etc.) En las sesiones de condicionamiento se le administran 60 pares de estímulos (EC y EI) al animal de experimentación, con un intervalo de tiempo entre ellos de 30 ± 5 segundos. En las cuatro sesiones de extinción de nuevo sólo se presenta EC, y también se aplican 60 estímulos (EC) separados cada 30 ± 5 segundos. Con estas últimas sesiones se intenta que olvide la tarea anterior al prescindir del EI o, desde otro punto de vista, que aprenda otra tarea nueva, distinta a la anterior: la eliminación de la respuesta condicionada.

Metodología

La estimulación eléctrica se administra con la ayuda de un estimulador CS-20, a través de dos unidades de aislamiento (Cibertec, S.A, Madrid, España). El paradigma utilizado es el de traza (choque eléctrico – choque eléctrico). En él, los dos estímulos, EC y EI, son de la misma modalidad sensorial. La pareja de estímulos se inicia con un choque eléctrico, aplicado en el párpado superior izquierdo, de muy corta duración (50 μ s) y muy débil (1 x intensidad umbral).

Como EI, se usa un choque eléctrico, aplicado también en el párpado izquierdo, de (500 μ s) de duración y con la intensidad suficiente para provocar un parpadeo reflejo (3 x intensidad umbral). El EI comienza 250 ms después de que finalizara el EC, (fig. 3.11).

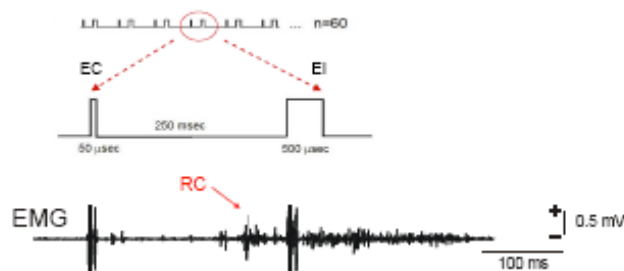


Figura 3.11: Paradigma de traza

Utilizado en el Condicionamiento Clásico del reflejo corneal

Las respuestas reflejas se miden al principio del experimento en todos los ratones. Para ello, se aplican pulsos catódicos cuadrados aislados de 50 μ s de duración y 2 x Umbral mA de intensidad. Se administra un pulso cada 30 segundos antes de empezar con las sesiones de habituación. De esta manera se comprueba la funcionalidad de los circuitos neuronales involucrados en la formación de las respuestas motoras palpebrales.

Se considera "respuesta condicionada", la respuesta electromiográfica que aparece en el período inter-estímulo, pero siempre 50 ms después del EC, para evitar confusiones con las respuestas reflejas a dicho estímulo. Para EMG

considerar esta respuesta como aprendida, además debe tener una duración mayor de 10 ms y el área de esta respuesta debe ser, al menos, 2,5 veces mayor que la actividad media grabada antes de la presentación del EC. Los datos obtenidos se almacenan directamente en un ordenador con un convertidor analógico-digital (*CED 1401 Plus, Cambridge, Inglaterra*) con una frecuencia de muestreo de 4 KHz y una amplitud de resolución de 12 bits. Se modifica un programa comercial de ordenador (*SIGAVG, Signal Averager* de CED) para representar, rectificar y promediar los registros EMG obtenidos.

Después se analizan los registros obtenidos para cuantificar el número de respuestas reflejas y condicionadas con la ayuda de programas de representación comerciales.

3.3.4. Condicionamiento de Preferencia de Plaza: prueba comportamental y de memoria:

La preferencia de plaza se lleva a cabo en una caja metálica rodeada por una serie de sensores en forma de infrarrojos para saber en todo momento donde se encuentra nuestro individuo y poder tener un seguimiento del movimiento de los mismos y al meter los datos obtenidos en el programa del ordenador MUX_XYZ16L de la empresa Cibertec. S.A. poder desarrollarlos y ver los resultados obtenidos.

Nuestro equipo para el estudio de la preferencia de plaza (CPP) consiste en un actímetro modificado y dividido en 2 ambientes diferentes mediante una pared metálica que tiene una puerta que se puede tener abierta o cerrada. Los ambientes son uno blanco con una malla metálica en la base para darle rugosidad y otro con rayas blancas y negras y liso para poder diferenciar ambos ambientes por más de un sentido (vista y tacto).

El estudio se realiza en 5 días según se describe en Tilley y Gu, 2008, y que se puede dividir en 3 fases. En la primera de ellas se realiza un *pretest* a cada individuo que tomará parte de nuestro estudio y el cual consistirá en dejar al ratón libre en la caja con la puerta abierta de la misma para que puede estar en cualquiera de los 2 ambientes de la misma y después de media hora recopilar los datos y meterlos en el programa MUX_XYZ16L de la empresa Cibertec. S.A.

y ver donde se sintió más a gusto (estuvo mayor tiempo) para intentar mediante la administración del medicamento antes de soltarnos en el lugar que queremos adaptar, que este prefiera este con respecto al otro ya que además antes de meterlo en el otro lugar solo le daremos una disolución de salino.

En la segunda fase, el *condicionamiento* consta de 3 días, en el primero de ellos (segundo día de estudio) se realizará con la puerta que separa ambos ambientes cerrada y constara de una doble sesión una por la mañana a las 9h donde meteremos al individuo en el ambiente que prefirió en el primer día (pretest) 15 minutos después de recibir la administración de una disolución salina 9gr/l (vehículo) de forma intraperitoneal. En dicho ambiente permanecerá durante media hora. Después de esto se sacará y se volverá a meter en su jaula a la espera de realizar la 2 sesión. La segunda sesión del día tendrá lugar a las 13h y mediante la misma forma (inyección peritoneal) unos 10 o 15 minutos antes de meterlo en el otro ambiente (aquel que no prefirió el primer día) administraremos el fármaco (al grupo experimental) o el vehículo (salino al grupo control) y lo soltaremos en el ambiente que queremos que se adapte ya que este fue en el que estuvo menos tiempo durante el pretest y donde asimilara la satisfacción que a priori le producirá la administración del fármaco y allí al igual que la primera sesión permanecerá durante un período de 30 minutos y con la puerta que separa ambos ambientes cerrada al igual que la primera sesión de este mismo día para obligarlo a que permanezca en dicho ambiente durante todo el tiempo establecido para la realización del estudio y durante este periodo (1/2 hora) asimile la satisfacción del medicamento a este ambiente.

El tercer y cuarto día se realizará las mismas sesiones con la misma duración y condiciones que las del segundo día.

En la tercera fase (el quinto día) se realiza el *test* definitivo del estudio que consiste en tener la caja con la puerta abierta y soltaremos al ratón en ella durante 30 minutos, en este caso sin administrarle ninguna solución. Se verá la preferencia de éste de un ambiente u otro mediante los sensores infrarrojo para ver si el propósito de nuestro estudio se cumple o no mediante la preferencia del lugar donde le administramos el fármaco y que en el pretest no prefería dicho ambiente.

La dosis de medicamento (metilfenidato) administrada durante la sesión de por la tarde 13h en el lugar que queremos adaptar ya que fue en el que menos tiempo estuvo dicho individuo en el pretest de los días 2, 3 y 4 fue de: 1mg/kg, por vía intraperitoneal.



Figura 3.12: Preferencia de plaza

Actímetro modificado en el que podemos observar los 2 ambientes bien diferenciados y donde la puerta está abierta por tanto debe ser el día del pretest (día 1) o el del test (día 5).

Hay 3 formas posibles de ver si el estudio de los ratones ha tenido los resultados esperados con la ayuda del fármaco una vez desarrollados los datos obtenidos en el programa MUX_XYZ16L (Cibertec. S.A.) Y separado en los 2 grandes grupos para ver los resultados según haya sido tratados con fármaco o salino y dentro de los cuales habrá 4 subgrupos.

Para realizar su estudio utilizaremos 3 métodos diferentes de evaluación, luego de ello escogimos el segundo método para evaluar a nuestra muestra de sujetos clonidina:

- El primer modelo: Nos sirve para comparar los tiempos (en segundos) que estuvieron en el pretest y test en la zona que queríamos condicionarlos (ambiente pareado al fármaco). Tenemos 2 grandes grupos (un fármaco u otro) y sus 8 subgrupos dentro de estos.

Este modelo nos sirvió de referencia para el estudio CPP gracias al artículo de Griffin et al., 2012.

- Segundo modelo (incremento de estancia): Tiempo (en segundos) de estancia en el ambiente pareado durante el test – tiempo (en segundos) de estancia en el ambiente pareado durante el pretest. (Para que se produzca dicho acondicionamiento debido al fármaco el resultado debe ser positivo ya que el tiempo del test debe ser mayor que el pretest).

Este modelo nos sirvió de referencia para el estudio para la preferencia de plaza gracias al artículo de Tilley y Gu., 2008.

- El tercer modelo es aquel que solo tiene en cuenta el tiempo que está el individuo en una zona o en la otra del test, su fórmula es: $(\% = \text{Tiempo en el lugar que queremos acondicionar} / \text{tiempo total test}) \times 100$, y se estudian 2 grupos según reciban medicamento o salino y dentro de los mismo 4 subgrupos para comparar los distintos resultados entre ellos.

3.3.5. Comportamiento Social

Unas de las características de los ratones es su comportamiento social y una manera de estudiar su actuación en estas situaciones es comparar sus interacciones en distintos periodos dentro de su especie.

3.3.5.1. Intruso

El modelo residente-intruso fue estudiado extensivamente por Blanchard, Takahashi y Blanchard (1977). Ellos colocaron un intruso en colonias donde hay uno o dos machos residentes. El macho residente dominante suele desplegar respuestas de agresión hacia el intruso, tales como olfateo, ataques laterales, persecución, arrinconamiento, mordidas, etc. (nosotros hemos visto conducta de copula). El intruso suele exhibir respuestas de sumisión, como permanecer congelado, colocarse de espaldas con las patas hacia arriba, arrinconarse, hacer boxeo defensivo o caminar agachado.

En estos experimentos se exponen individualmente a todos los ratones de todos los grupos durante dos días consecutivos a la misma hora, durante 5

minutos, en su jaula habitual a la presencia de un intruso (visitante). Se utilizaron 25 ratones clonidina CD1 y 5 silvestres.

El primer día la prueba consiste en poner en una habitación aislada con luz tenue la jaula del animal de experimentación durante 5 minutos sin ninguna intervención. Seguidamente se introduce el intruso durante otros 5 minutos y se observa el comportamiento del residente (ratón experimental) con respecto al visitante (intruso). El segundo día se repite el procedimiento omitiendo los cinco minutos previos sin intervención.

El procedimiento es seguido por el investigador en todo momento y grabado por un equipo de videocámara ocular de lectura en pantalla (*Auxilab 3 MP*) con software de análisis de imagen y registrado en un ordenador, para su posterior visualización y evaluación.

Dentro de los patrones para los que están motivados los ratones ante una situación de invasión espontánea de territorio, se mide: a) la latencia del primer acercamiento (conducta de oler), b) el número de veces que se huelen, c) la latencia de la primera agresión, d) el número de veces que se pelean, e) el número de intentos fuga, escaparse y fugarse) el número de intentos de cópulas (observación), teniendo en cuenta qué ratón lleva la iniciativa, para su posterior control, (fig. 3.12).



Figura 3.12

Imagen aérea de una instantánea de la prueba de intruso (segundo día). Se observa el ratón experimental (blanco, cepa CD-1) frente al intruso (ratón negro) dentro de la jaula del residente.

3.3.5.2. Prueba de Etanol

El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó conforme a los procedimientos aprobados por el Comité de Ética de Investigación local Institucional del CABD. Los esfuerzos fueron hechos para reducir al mínimo el número de animales usados. Se utilizó el test de elección de dos opciones de botella, para beber agua o etanol. Etanol absoluto, obtenido de Panreac Quimica SAU (Barcelona España) se diluyó al 2.5 %, el 5 %, el 10 % o el 20 % (la v/v) con una solución en agua.

En el experimento le dimos a los ratones la opción de beber, entre el etanol (el 2.5 %, w/v) y el agua sola, tenían el acceso continuo a ambos botes de alcohol y del agua. La concentración de etanol fue aumentada del 2.5 % al 20 % (el 2.5 %, el 5 %, el 10 %, y el 20 %, w/v) con el acceso de 4 días en cada concentración. Cada día, el consumo fue registrado y los botes cambiados de lado, para evitar preferencias de lugar. Todos los días se registraron los pesos de los sujetos (ratones) y de los botes a una misma hora. Al concluir el experimento se realizó la eliminación de los sujetos según el protocolo del laboratorio.

3.4. PERFUSIÓN Y PREPARACIÓN DE HISTOLOGÍA

Al final de los experimentos, los ratones fueron sacrificados siendo profundamente anestesiados con una solución de hidrato de cloral al 4% (10ml/kg). Una vez anestesiado el animal y alcanzado el plano quirúrgico (ausencia de reflejo podal) los cerebros se fijan por perfusión transcardiaca con salino al 0,9% y paraformaldehído al 4% con una aguja. Se extrajo el cerebro del interior de la cavidad craneal en un periodo de tiempo menor a tres minutos y se introdujo individualmente en un tubo con paraformaldehído para un período de postfijación a 4°C, de cuatro horas, pasadas las cuales se incubó durante 24 horas en PBS más sacarosa al 30%, igualmente mantenida a 4°C, para crió-proteger el tejido. Se obtuvieron cortes en rodajas en Crió-tomo (Leica, Wetzlar, Alemania) de 50 µm. coronales de la parte rostral del encéfalo (incluyendo corteza e hipocampo) y cortes sagitales de la parte caudal (tronco del encéfalo) para su posterior análisis histológico.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron de forma estadística usando el programa SigmaStat 3.0 en un primer momento y luego el programa IBM SPSS Statistics 18.0 (IBM, Armonk, New York, EE.UU.). En las gráficas se representan el promedio \pm error estándar. Para analizar la significación estadística de los distintos datos, se realizó el test ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

Con el fin de estudiar el efecto postnatal a largo plazo (5 meses en promedio) de la aplicación de clonidina sobre la conducta sensitivomotora y cognoscitiva en los ratones CD-1, tanto los sujetos control (n=36, procedentes de tres camadas) como los ratones tratados con Clonidina (Clo, n=55, procedentes de cinco camadas) y después que el grupo haya obtenido resultados con clonidina durante la etapa neonatal (Calvino Núñez y Domínguez del Toro, 2014); se efectuó una serie de pruebas para medir respuestas sensitivas, motoras, cognoscitivas y comportamiento social como: La analgesia por la técnica de Hot-Plate (prueba sensorial), las habilidades motoras se evaluaron mediante las pruebas de Actímetro e Inhibición por prepulso, las capacidades memorísticas y cognoscitivas se evaluaron por las técnicas de reconocimiento de objetos, evitación pasiva y condicionamiento del reflejo palpebral y finalmente las respuestas comportamentales y sociales por la preferencia de plazas, intruso y prueba de etanol.

De partida, no se observaron diferencias en el grupo de animales tratados con respecto al grupo control, tanto en lo que se refiere al tamaño de las camadas, como en lo referente a la tasa de supervivencia, que fue la misma para ambos grupos a lo largo del experimento.

Al pasar los 150 días (5 meses), los ratones clonidina eran más propensos a morir antes (por ejemplo, al aplicarle anestesia local para la cirugía al implantarle los electrodos), durante o después de realizar alguna prueba mencionada anteriormente, presentaban mayor vulnerabilidad, que los control.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de las pruebas mencionadas aplicadas a los sujetos experimentales

4.1. ANALGESIA: HOT-PLATE (TEST DE LA PLACA CALIENTE)

Cuando se colocan a los animales sobre una placa a 52,2 °C y con el fin de evaluar el efecto a largo plazo en la percepción del dolor (sensibilidad), en los clonidina adultos. Se estudiaron dos variables T1 y T2. La primera de ellas fue el tiempo, medido en segundos, empleado por los distintos grupos en lamerse las patas por primera vez, adoptada como medida del umbral doloroso (sensibilidad, T1). El siguiente parámetro estudiado fue la respuesta comportamental al dolor, T2, que representa la latencia, medida en segundos, que el animal empleó en intentar escapar de la placa caliente alzándose tres veces sobre las paredes de metacrilato, apoyando las dos patas delanteras o dando un salto escapando así de la placa.

El grupo control se lame las patas en un tiempo que ronda los 9 segundos ($9,62 \pm 0,92$ segundos) en los machos y ($11,43 \pm 1,13$ segundos) en las hembras, mientras que en el grupo clonidina la respuesta se enlentece no significativa ($11,04 \pm 0,75$ segundos) para los machos y ($12,02 \pm 0,72$ segundos) para las hembras. ($p=0,2319$)

Separados por sexos en el WT, no existen diferencia significativa entre machos y hembras ($9,62 \pm 0,92$ segundos frente a $11,43 \pm 1,13$, respectivamente, $p=0,2518$). De igual forma en el grupo clonidina ($11,04 \pm 0,75$ segundos frente al $12,02 \pm 0,72$; $p=0,3682$) no existe una diferencia significativa.

En la respuesta conductual al dolor, medida al tercer intento de fuga, se observa una ligera diferencia cuasignificativa en el grupo de las hembras, entre el grupo control (WT) y el que recibió el tratamiento con clonidina (clo) ($27,07 \pm 2,69$ segundos frente al $32,30 \pm 3,83$ ($p=0,354$), respectivamente. Éste incremento en la latencia de respuesta nos indicaría que existe una mayor ansiedad ante el dolor en dicho grupo. ($p < 0,05$). Como se muestra en las fig. 4.1 y 4.2, las cuales representan el tiempo (en segundos) que tardaron los sujetos machos y hembras experimentales en lamerse las patas por primera vez (umbral doloroso, T1) y la latencia que emplearon en mostrar una respuesta de huida frente al dolor (respuesta comportamental al dolor, T2). En (A) Machos y (B)

hembras CD1; nótese como los animales control tardaron más en responder al T1, que los tratados con clonidina (CLO) en lamerse las patas por primera vez. Para la variable T2 hubo una diferencia, mientras que los animales control en (A) mostraron una latencia mayor de huída frente a los sujetos CLO. En B resultó lo contrario que las hembras silvestres huían con menor latencia que los CLO. Por ello se hablaría de hiporreactividad en los CLO hembras ($p < 0,05$).

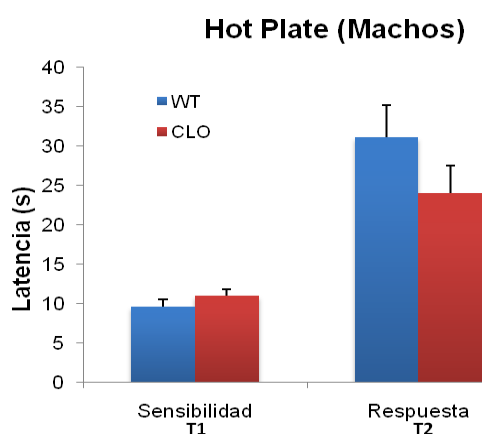


Figura 4.1: Placa caliente

Test de la placa caliente en sujetos machos tanto silvestre (WT), como clonidina (Clo): Latencia T1: Sensibilidad a dolor y T2 Respuesta al dolor (1er y 3er intento de fuga respectivamente).

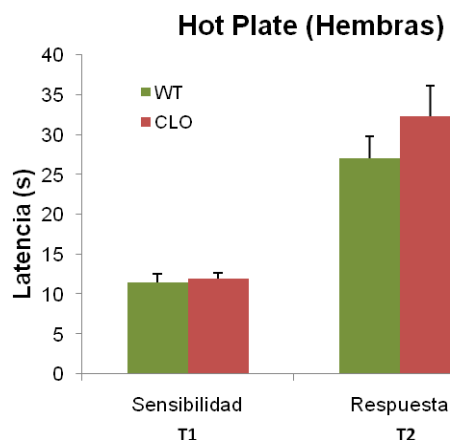


Figura 4.2

Test de la placa caliente en sujetos hembras tanto silvestre (WT), como clonidina (Clo): Latencia T1: Sensibilidad a dolor y T2 Respuesta al dolor (1er y 3er intento de fuga respectivamente).

4.2. PRUEBAS MOTORAS: INTERVENCIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA

Con el fin de medir la influencia del sistema noradrenérgico en la actividad motora y exploratoria de los animales adultos clonidina (CLO) de 5 meses de edad en promedio, se realizó la prueba del campo abierto durante diez minutos con el actímetro medidos en diferentes tiempos parciales. La medida de la actividad, dada por los cortes de los haces de luz infrarroja, se representa de modo acumulado a lo largo del tiempo. (Cibertec, S.A.) (Ver Metodología).

4.2.1 ACTÍMETRO: Prueba de Campo abierto

La actividad motora del grupo silvestre (WT) y clonidina (CLO) sigue una trayectoria ascendente tal como se muestra en la fig. 4.3. Y 4.4. Según aumenta la permanencia en el perímetro de medida, el grupo con más actividad es el clonidina machos (CLOM) ($4533,13 \pm 151,33$) frente a los WT machos ($4107,46 \pm 141,49$) presentando diferencias estadísticamente significativas de ($p < 0,05$) a los dos minutos ($p = 0,015$), a los cinco minutos ($p = 0,051$) y diez minutos ($p = 0,054$) significativas. Produciéndose así un mayor número de cortes de los haces infrarrojos (en ambos ejes x e y) para los ratones clonidina. Se podría afirmar que los CLO M presentan cierta hiperactividad. Por otro lado nuestros sujetos CLOH presenta: ($4053, 84 \pm 145,56$ cortes), frente a los WTH $4316, 33 \pm 48,21$), donde no existe diferencia estadísticamente significativa, aunque resultaron ser menos activas que el WT en la prueba.

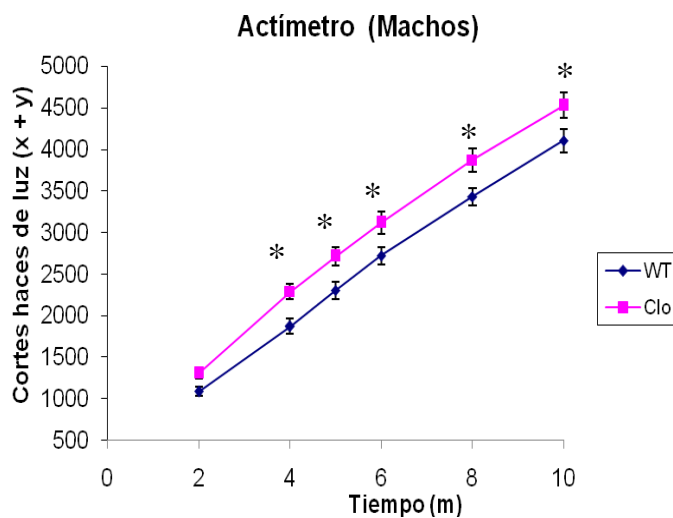


Figura 4.3: Actímetro (Machos)

Actividad exploratoria acumulada a los 2,4, 6,8 y 10 minutos. En conjunto, la actividad exploratoria es mayor en los animales clonidina que en los silvestres, observando cierta tendencia a la hiperactividad en el adulto a pesar de estar bajo efecto de la clonidina

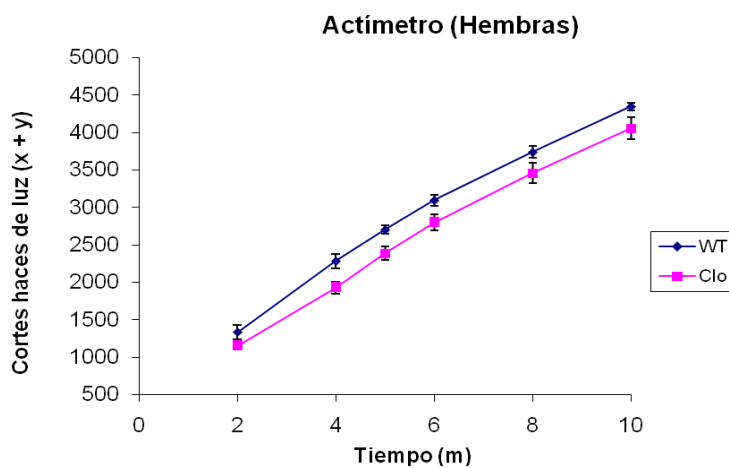


Figura 4.4: Actímetro (Hembras)

Representación de la actividad exploratoria acumulada de los grupos experimentales a los 2, 4, 5, 6, 8 y 10 minutos. En conjunto, la actividad exploratoria es mayor en los animales del grupo control que en los CLO H, observando cierta tendencia a la hipoactividad en el CLO H, a pesar de estar bajo efecto de la clonidina. No se encontró diferencia significativa entre los dos grupos.

Como medida de la ansiedad, se estudió la actividad exploratoria en el centro del actímetro. Al observar la fig. 4.5, se puede ver que para ambos grupos no existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en el tiempo empleado en el centro del actímetro a los 5 minutos. Sin embargo, el grupo tratado con clonidina (CLOM), mostró una tendencia a permanecer menos tiempo en el centro, presentando un mayor nivel de ansiedad, frente a (WT M), aunque no resultó ser estadísticamente significativa.

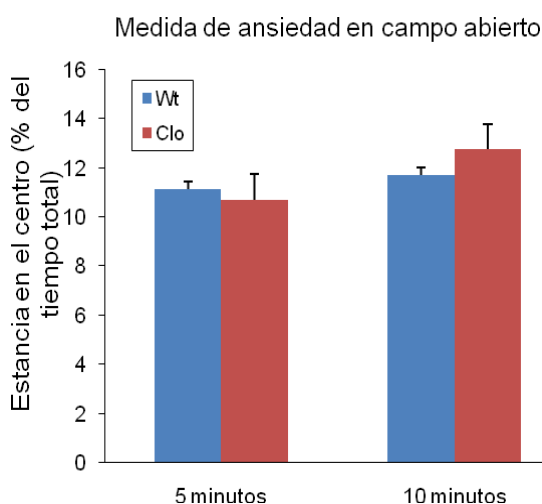


Figura 4.5: Actímetro (Ansiedad)

Representación de la actividad exploratoria acumulada a los 5 y 10 minutos de su estancia en el centro del actímetro, medido en porcentajes. Se observa un ligero aumento de respuestas a los 10 minutos del clonidina (CLO), frente al WT. Observándose mayor ansiedad que el grupo control, aunque no exista diferencia significativa.

4.3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO Y EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO

Para evaluar los procesos de atención, memoria y aprendizaje asociativo; además de observar las posibles anomalías en éstos tras las distintas alteraciones en el sistema adrenérgico, se realizó las siguientes pruebas:

4.3.1. EVITACION PASIVA

Tras el estudio del comportamiento motor, se pasó a la realización de una serie de pruebas relacionadas con distintos tipos de memoria. La primera de estas pruebas fue la *Evitación pasiva* como medida de un tipo de memoria emocional que suele implicar la participación de la amígdala. Como se puede observar en la fig. 4.6, los animales silvestres mostraron una latencia significativamente mayor en el compartimento con luz, para la memoria a corto plazo (MCP) frente a los ratones clonidina ($p = 0,006$) ($p < 0,05$).

En la sesión de memoria a largo plazo (MLP), se volvieron a repetir los resultados obtenidos en la anterior sesión para los animales silvestres y los sujetos clonidina. Los ratones clonidina mostraron una mayor rapidez de entrada en el compartimento oscuro frente a los animales silvestres ($73,94 \pm 14,98$ s para los ratones silvestres frente a $36,83 \pm 7,56$ s de los animales clonidina; $p = 0,003$, $p < 0,05$). Como complemento a la variable de latencia en el compartimento con luz, se estudió el porcentaje total de entradas de los distintos grupos para las tres sesiones experimentales. Así, como se puede observar en la fig. 4.5, todos los animales entraron en el compartimento oscuro en la primera sesión de la prueba, mientras que para la sesión de memoria a corto plazo, sólo el $4,18 \pm 0,60$ por ciento de los animales silvestres entraron en la caja oscura frente al $5,34 \pm 1,17$ por ciento de los sujetos clonidina. Para la sesión de memoria a largo plazo, los resultados obtenidos entre los grupos en la sesión anterior se repitieron, entrando un $4,80 \pm 0,69$ por ciento de los sujetos silvestres frente al $4,07 \pm 1,45$ por cien de los clonidina, utilizando como medida promedio la mediana en éste caso. ($p < 0,050$). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones silvestres y los clonidina ($p = 0,003$).

La respuesta de grupo clonidina no fue el esperado con respecto al grupo control, se observa que en las respuestas del grupo WT, las hembras presentan una diferencia significativa con respecto al grupo tratado con clonidina del mismo sexo, tanto a la 1H como a las 24H ($87,64 \pm 14,38$ y $104,90 \pm 18,05$ frente a los $52,52 \pm 12,79$ y $37,801 \pm 12,53$ respectivamente), observándose una diferencia significativa mayor en la respuesta de MLP, $p=0,009$ ($p < 0,05$).

Del resultado en la fig. 4.5, si comparamos por sexo, podemos observar que existe una ligera diferencia aunque no significativa estadísticamente ($p < 0,05$), entre las hembras y los machos del grupo Clonidina, presentan un mayor número de respuestas a 1H (memoria a corto plazo) y a las 24H las hembras, ($44,81 \pm 12,05$ y $31,73 \pm 8,32$ frente a $55,52 \pm 12,79$ y $37,01 \pm 12,52$ respectivamente), de igual forma en el grupo WT ($198,83 \pm 93,09$ y $151,17 \pm 71,98$ frente a $41,04 \pm 23,31$ y $23,83 \pm 4,19$ respectivamente).

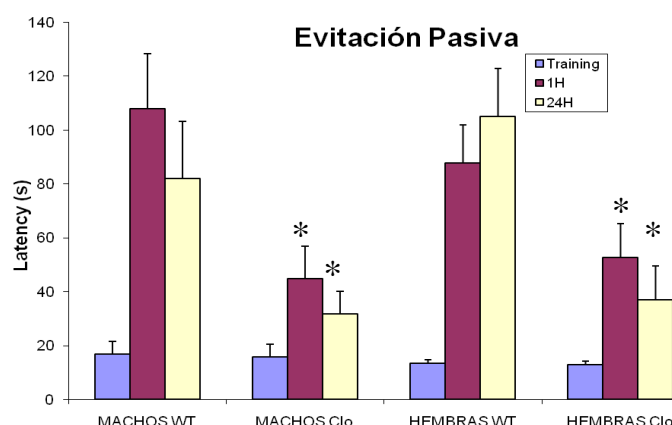


Figura 4.6: EVITACION PASIVA

Latencia empleada por el grupo control WT y el grupo de estudio CLO CD1, en cruzar al compartimento oscuro en cada una de las tres sesiones correspondientes a la prueba de la *Evitación pasiva* (entrenamiento, memoria a corto (MCP) y a largo plazo (MLP)). Nótese como los animales CLO CD1, presentaron una latencia de entrada menor que los sujetos silvestres (WT) para todas las sesiones de la prueba. Los sujetos de estudio CLO, entraron antes en la cámara oscura que los ratones silvestres en la sesión de MCP; ambos grupos, los CLO M y los CLO H, no existiendo diferencias significativas entre ambos. Y en la MLP nótese como los animales silvestres WTH, si aprenden ante el estímulo aversivo, mientras que el WT macho, presenta una menor latencia de entradas al compartimento oscuro que las hembras WTH, presentando similar comportamiento el grupo de estudio de CLOM y CLOH pero en menor tiempo, podríamos hablar de una menor ansiedad en los sujetos hembras en general a pesar del estímulo aversivo; aunque el grupo silvestre WT presenta siempre una latencia mayor que los clonidina tanto para machos y hembras.

4.3.2. Reconocimiento de objetos

Continuando la evaluación del aprendizaje se realizó la prueba de reconocimiento de objetos en los sujetos de estudio clonidina (CLO CD1). Primero se realizó la sesión de entrenamiento para ambos grupos que los denominaremos (E), luego a la hora se procedió a evaluar la memoria a corto plazo (MCP), después de ello se procedió a evaluar la de memoria a largo plazo (MLP), realizada a las 24 horas de la sesión de entrenamiento. Se estudió el índice de exploración del objeto novedoso frente al objeto conocido para cada una de las sesiones experimentales. Un coeficiente de 0,5 significó que los animales exploraron un mismo número de veces el objeto conocido y el objeto nuevo.

Los dos grupos experimentales presentaron un índice de exploración de 0,5 en promedio en la sesión de entrenamiento. No obstante, fue en la sesión de la memoria a corto plazo y en la de largo plazo, donde existieron diferencias entre los grupos experimentales. Así, como se puede observar en la fig. 4.7, para la memoria a corto plazo, los animales silvestres presentaron una mayor exploración del objeto novedoso frente al conocido en machos y hembras ($0,57 \pm 0,02$ y $0,55 \pm 0,02$, respectivamente que representaría el índice de exploración). Mientras que los clonidina machos y hembras obtuvieron un resultado menor ($0,40 \pm 0,02$ y $0,43 \pm 0,02$ respectivamente, índice de exploración). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Para la sesión de memoria a largo plazo, los animales silvestres se mantuvieron en valores similares de exploración que en la sesión anterior para machos y hembras ($0,54 \pm 0,02$ y $0,55 \pm 0,04$), contactando un mayor número de veces con el objeto nuevo que con el objeto conocido. Sin embargo, los ratones clonidina disminuyeron su coeficiente de exploración en comparación con la sesión anterior, presentando un valor de $0,44 \pm 0,03$ y $0,43 \pm 0,02$ en machos y hembras clonidina respectivamente. Esto significó que exploraron ambos objetos un mismo número de veces aproximadamente, como pasó en la sesión de entrenamiento Sin embargo, como ocurrió en la sesión de memoria a corto plazo, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

De forma general, observando los resultados obtenidos en las pruebas de memoria realizadas: la memoria a corto plazo (1 hora) y largo plazo (24 horas) de los ratones cuando se los enfrenta a un espacio con objetos conocidos y novedosos. Se observa en el grupo de los animales silvestres, en la prueba a corto plazo (1H), incrementa el índice de exploración del objeto novedoso alrededor de 0,56, mientras que el grupo clonidina desciende hasta 0,41, lo que indica que los sujetos tratados con CLO, prefieren el objeto conocido al novedoso.(conducta neofóbica) y con respecto a la memoria a largo plazo (24 horas); de forma similar el grupo de control presenta un índice de exploración mayor que el del grupo CLO, (0,55 frente a 0,44 respectivamente), habiendo ligera diferencia aunque no significativa.

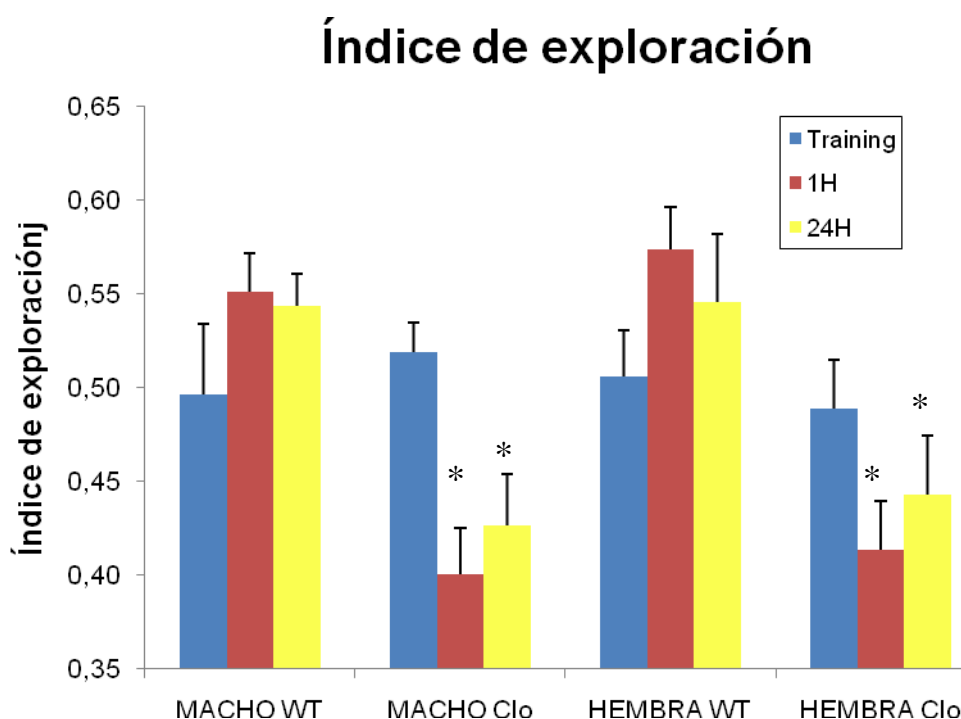


Figura 4.7: Índice de exploración del objeto novedoso en la prueba de reconocimiento de objetos

Gráfica normalizada de reconocimiento de objetos, en la que se tiene en cuenta los valores que presentan los distintos grupos en el entrenamiento para representar las siguientes etapas de la prueba. Valorado en porcentajes. Se pretende analizar la capacidad atencional y memorística de los ratones. El resultado tanto en la memoria a corto plazo (MCP), como la memoria a largo plazo (MLP), es la preferencia por el objeto conocido en todos los grupos. Como se puede observar para la memoria a corto plazo los sujetos control presentaron mayor índice de exploración que los clonidina tanto en machos y hembras ($0,55 \pm 0,02$ y $0,54 \pm 0,02$) a 1H y 24H, frente a ($0,40 \pm 0,02$ y $0,43 \pm 0,02$) en machos respectivamente y ($0,57 \pm 0,02$ a 1H y $0,55 \pm 0,04$ a 24H), frente a ($0,41 \pm 0,02$ y $0,44 \pm 0,02$) en sujetos hembra. Presentando los clonidina neofobia con respecto al objeto novedoso.

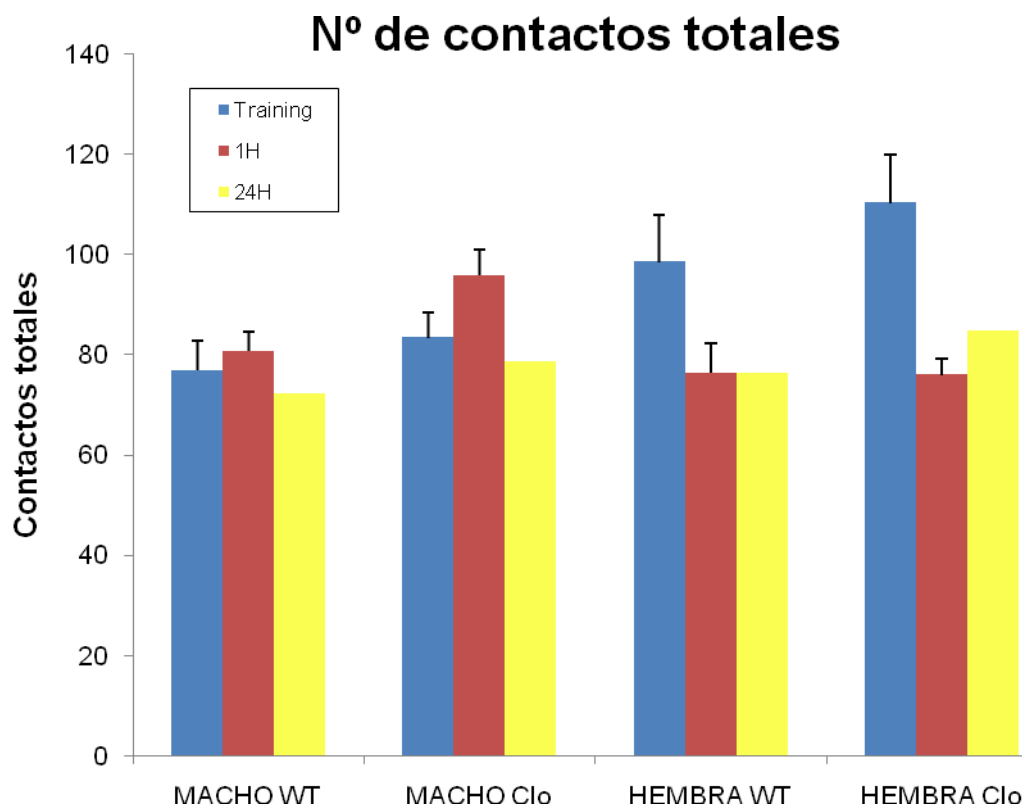


Figura 4.8: Indicie de número de contactos

Número de contactos con el objeto novedoso, con respecto al total de contactos, efectuados por cada uno de los sujetos para las sesiones de la prueba de *Reconocimiento de objetos* (entrenamiento (E), memoria a corto (MCP) y a largo plazo (MLP)). Un índice de exploración de 0,5 indica que el animal exploró ambos objetos un mismo número de veces, mientras que un índice mayor de 0,5 indica que contactó más con el objeto nuevo. Nótese como en la sesión de MCP los animales clonidina hembra (CLOH), mostraron una tendencia a explorar menos el objeto novedoso que los animales silvestres. En la sesión de MLP los animales clonidina, presentaron una tendencia a mostrar menores contactos que los animales silvestres.

Otra de las variables que se analizan en esta prueba es el número total de contactos realizados por cada grupo en las distintas sesiones. En el entrenamiento (E), el grupo control ($90,88 \pm 6,26$ contactos) presenta menor número de contactos que el grupo clonidina ($110,19 \pm 9,64$ contactos). Mientras que en la memoria a corto plazo (MC), esto cambia presentando el grupo control ($76,69 \pm 3,78$ contactos) y los clonidina ($74,31 \pm 3,78$), mientras que en la memoria a largo plazo (MLP) vuelve a parecer que el número de contactos del grupo control ($76,69 \pm 3,78$), frente a los ($84,81 \pm 4,53$) del grupo clonidina, no presentan diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

4.3.3. PRUEBA DE SOBRESALTO E INHIBICIÓN POR PRE-PULSO

Con el fin de valorar la magnitud y latencia de la respuesta de sobresalto de los grupos experimentales se analizó el valor medio de latencia de respuesta (VMLR) y el valor medio del pico (VMP) en la llamada línea base (20 primeros pulsos administrados de 125 dB durante 100 ms). Así se puede observar en la fig. 4.9 como los animales clonidina mostraron un valor de latencia de respuesta significativamente mayor que los ratones silvestres, pasando de 11.11 ± 1.17 s a 13.30 ± 1.10 s en el grupo de los machos ($p < 0,05$) y de 12.12 ± 1.32 s a 14.92 ± 1.14 s en el grupo de las hembras ($p < 0.05$). Para la variable VMP los grupos clonidina también presentaron valores de intensidad superiores a los mostrados por el grupo WT ($p < 0.05$) (Fig. 4.10.). De este modo los ratones WT mostraron una intensidad de 7.61 ± 1.44 frente a los 23.23 ± 5.64 del grupo Clonidina en los machos; los ratones WT hembras mostraron una intensidad de 7.88 ± 1.72 frente a la intensidad de 21.58 ± 6.42 del grupo clonidina hembra.

A continuación, se estudió la inhibición de la respuesta de sobresalto tras la aplicación de un prepulso de 85 dB y 50 ms de duración. Para analizar esta inhibición se utilizó la fórmula matemática incluida en el artículo de López-Ramos y otros, 2010:

$$(IPP = \frac{\text{Startle/Prepulso}}{\text{Linea base}} \times 100)$$

Se analizó si el prepulso inhibía el valor medio del pico de intensidad de respuesta) (fig. 4.11).

Observando la fig. 4.11, se puede ver como los animales clonidina mostraron un valor significativamente menor de inhibición para el valor del pico que los ratones silvestres ($p = 0,015$). Obteniéndose una inhibición de $37,56 \pm 5,36$ % para el grupo silvestre macho frente a $25,06 \pm 5,42$ % del grupo clonidina

Resultados

macho; y una inhibición de $46,76 \pm 3,41$ % para el grupo silvestre hembra frente a $37,99 \pm 5,46$ % del grupo clonidina hembra).

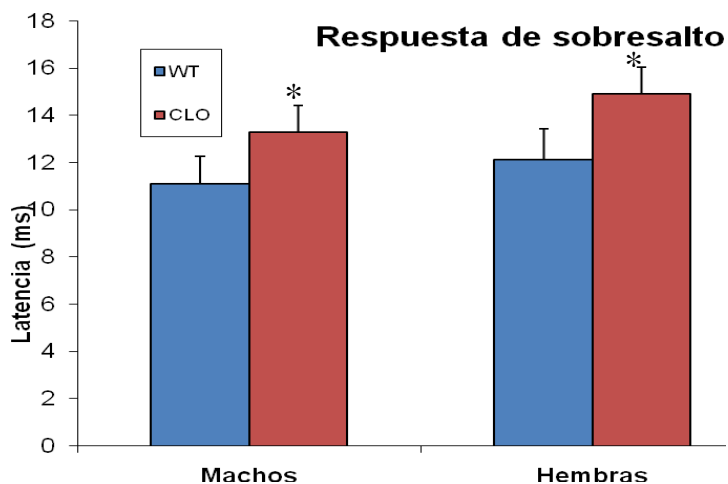


Figura 4.9: Histograma que representa la latencia de respuesta de los ratones controles frente a los ratones tratados con clonidina. Tiempo en milisegundos que tarda en reaccionar el ratón tras emitirse un sonido

En el sobresalto, la latencia de respuesta es el tiempo que tarda el ratón en reaccionar tras emitirse el sonido. Lo más destacado de los resultados obtenidos es que a intensidad de 120dB los ratones tratados con clonidina presentan un ligero (significativo) incremento en la latencia de respuesta, tanto con los controles machos como en hembras. La respuesta se sitúa en torno a 13 ms.

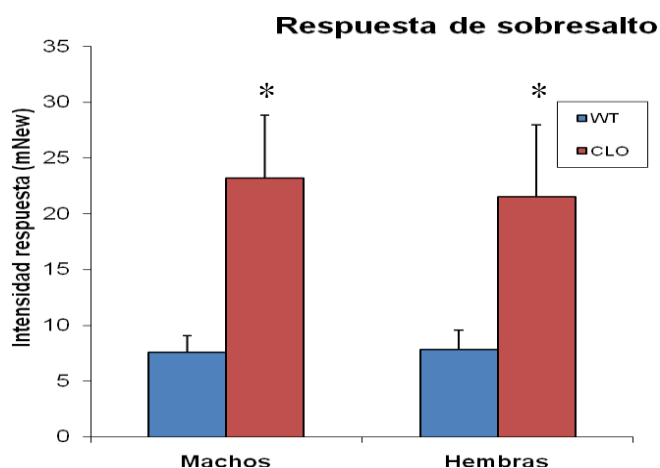


Figura 4.10: Intensidad de la Respuesta

Valor del Pico de los ratones controles frente a los ratones tratados con clonidina. Fuerza, medida en mNewton/m², ejercida por el ratón colocado sobre una superficie del sistema por el reflejo de sobresalto ante un estímulo acústico.

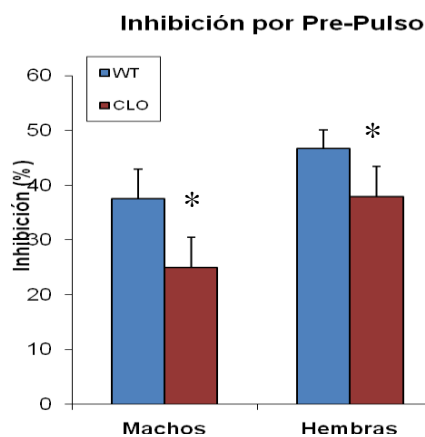


Figura 4.11: Sobresalto e Inhibición por prepulso

Histograma que representa el porcentaje de inhibición por prepulso (IPP) para el valor medio del área (VMA) presentada por los ratones de los dos grupos experimentales en la prueba de Inhibición por prepulso. Nótese como no se hallaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

4.3.4. Condicionamiento Clásico palpebral

Como última prueba cognoscitiva, se estudió la capacidad de aprendizaje de los grupos experimentales mediante el condicionamiento clásico del reflejo palpebral, usando un paradigma de huella o traza.

Primeramente se midieron las respuestas reflejas ante el estímulo eléctrico que se iba a aplicar en el párpado como estímulo condicionado. Puede verse en la fig. 4.12 que la latencia de aparición de los componentes R1 y R2 de la respuesta refleja aparecen en el grupo clonidina con retraso con respecto al grupo WT. R1 aparece con dos segundos de retraso (de 8 a 10 s) mientras R2 aparece con 4 segundos de retraso (de 16 a 20 s).

Con respecto a la amplitud de dichos componentes, también hemos comprobado que ambos son mucho menos intensos en el grupo tratado con clonidina.

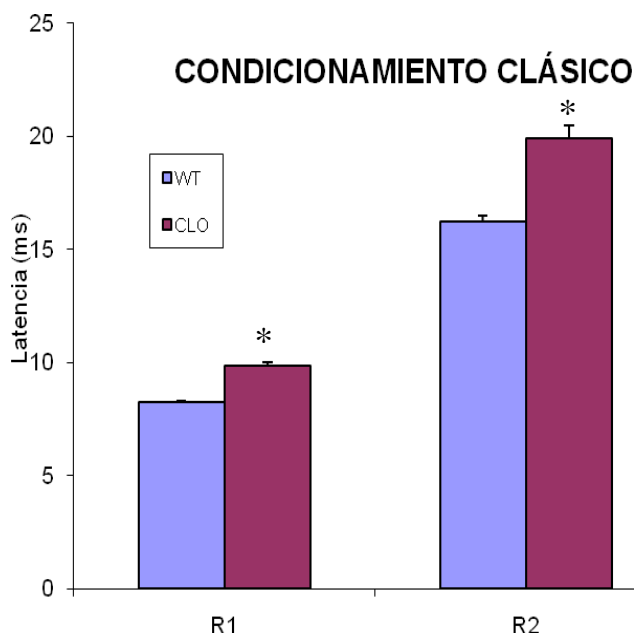


Figura 4.12

Latencia de los componentes de la respuesta palpebral refleja.

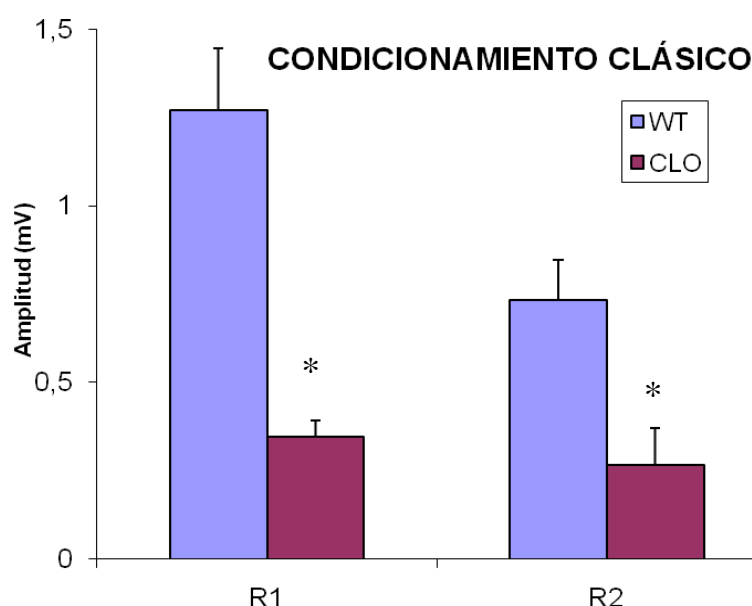


Figura 4.13

Amplitud de los componentes de la respuesta palpebral refleja

En la fig. 4.14. Se muestra la curva de aprendizaje, medida como porcentaje de aparición de respuestas condicionadas por sesión de condicionamiento, de los animales investigados. Los ratones del grupo control muestran un aumento en el porcentaje de respuestas condicionadas, desde el primer día en que reciben el par de estímulos, hasta llegar a un máximo en torno al 54%, en las sesiones C6-C7, significativo con respecto al porcentaje de respuestas de la habituación. Ronda el 62%, presentando una media de 47% de respuestas en las sesiones de condicionamiento. Los ratones del grupo clonidina fueron incapaces de incrementar el porcentaje de respuestas condicionadas. En cuanto a las diferencias estadísticamente significativas, los son para todas las sesiones de condicionamiento. Únicamente en la habituación no se encontraron diferencias significativas.

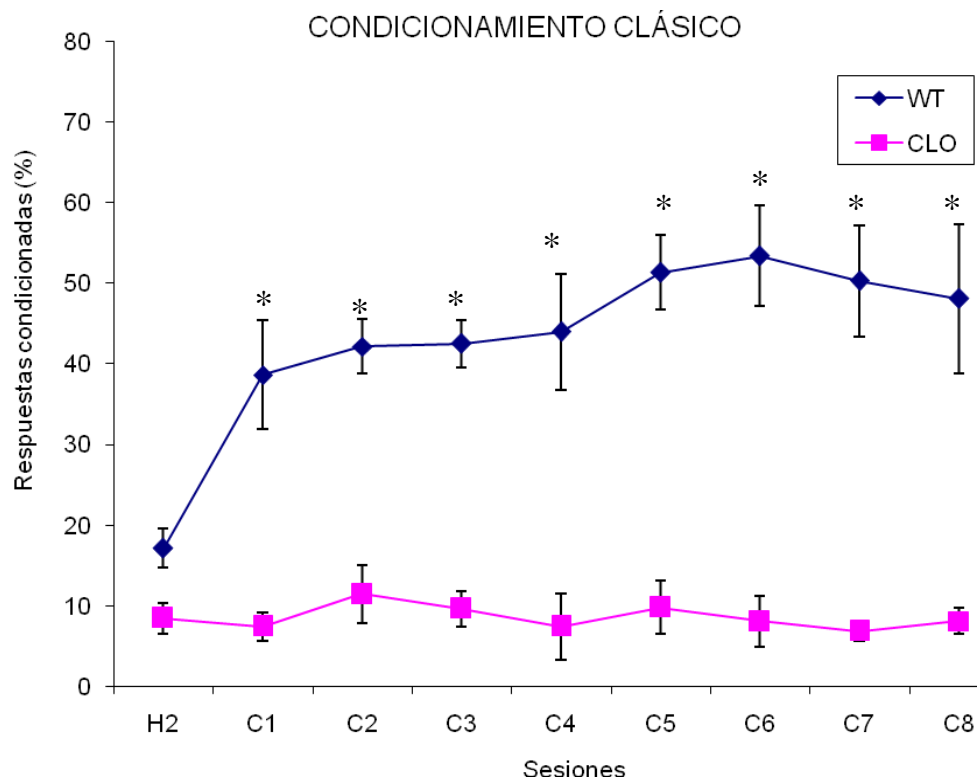


Figura 4.14: Curvas de aprendizaje asociativo. Evolución del porcentaje de respuestas condicionadas de los dos grupos de ratones control WT y clonidina CLO a lo largo de las sesiones de condicionamiento (C1 a C8). H2. última sesión de habituación.

Se muestra la evolución temporal del porcentaje de respuestas condicionadas, durante un condicionamiento con el paradigma de traza (choque eléctrico-choque eléctrico). Cada punto representa el valor medio de porcentaje, obtenido durante las sucesivas sesiones diarias, de aprendizaje por grupo. Se observa como el grupo control presenta un número mayor de respuestas que el grupo clonidina.

4.4. PRUEBAS SOCIALES Y COMPORTAMENTALES

4.4.1. Test del Intruso

Sobre esta prueba se presentan los datos más representativos del comportamiento que tiene el ratón ante la presencia repentina de un intruso, como la primera vez que se huelen. En la fig. 4.15, se muestra para el primer día, que el grupo control ($8,66 \pm 0,88$ segundos) presenta mayor latencia que el grupo clonidina ($5,33 \pm 0,88$ segundo) (1er acercamiento) no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se realizó la medición de conductas que se presenta en el siguiente cuadro con el fin de encontrar diferencias significativas entre las presentadas por el silvestre y por los clonidina, obteniéndose una diferencia significativa de $p = 0,0035$ en la conducta copulativa de los ratos silvestre y los clonidina.

CONDUCTAS	WT	CLO	* ($p < 0,05$)
Nº de contactos	$144 \pm 31,785$	$122,6 \pm 11,41$	0,4468
Tiempo del 1 ^{er} acercamiento	$8,666 \pm 0,88$	$5,33 \pm 0,882$	0.082
Nº de agresiones	$4 \pm 2,08$	$2,67 \pm 0,76$	0.475
Olfateos	$90,0 \pm 12,5$	$73 \pm 4,46$	0.135
T. de agresión	$6,00 \pm 2,081$	$4,48 \pm 0,877$	0.574
Cdta. Copulativa	$9 \pm 1,5275$	$3,67 \pm 0,655$	0.0035*

Figura 4.15

Tabla correspondiente a los comportamientos de los sujetos de estudio Clonidina (CLO) Cd1 adultos en comparación con los sujetos control (WT). Nótese como el grupo tratado con clonidina mostró menos conductas de acercamiento social en comparación con el grupo control. No existe diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de ella excepto en la conducta copulativa con ($p = 0,0035$), que lo describiremos en las siguientes gráficas, también presentamos la gráfica con respecto al número de contactos para observar interacción social.

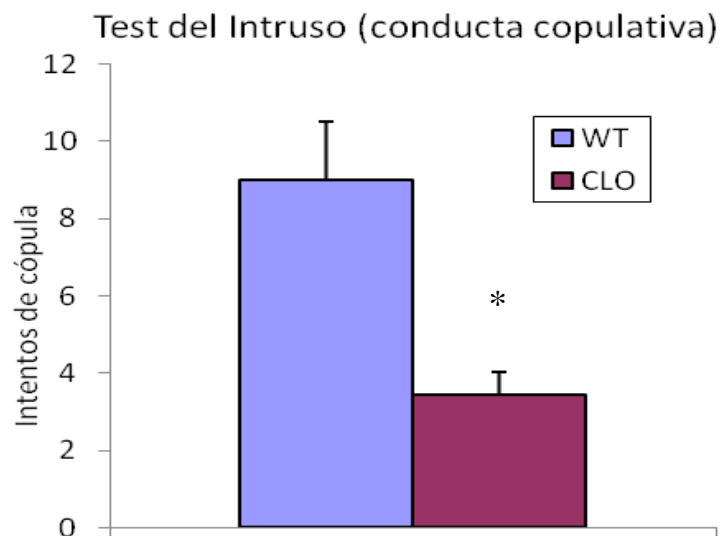


Figura 4.16

Gráfico que demuestra que en el comportamiento (número de intentos de cópula), de los ratones del grupo control (WT) es mayor que para los clonidina, obteniéndose una diferencia significativa de $p=0,0035$, siendo estadísticamente significativa, $p<0.05$

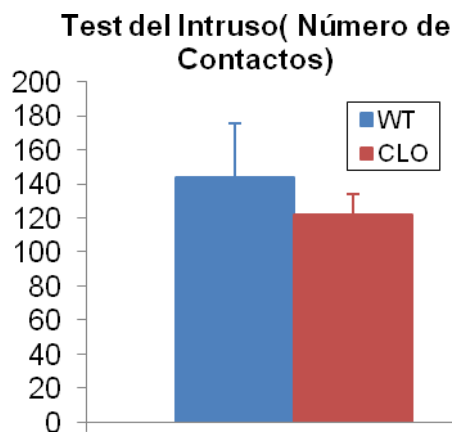


Figura 4.17

Se observa que en el número de contactos con un ratón externo, el acercamiento del WT es mayor que en el clonidina, podríamos decir que los clonidina tienden a ser menos sociables con respecto a un tercer sujeto del laboratorio

4.4.2. Condicionamiento de Preferencia de plaza

Siguiendo el estudio Tilley y Gu, 2008, el estudio se realiza en 5 días como se describió en la metodología y lo dividimos en 3 fases. En la primera de ellas realizamos un *pretest* a cada individuo del grupo de estudio clonidina y control (WT), el cual consistió en dejar al ratón libre en la caja con la puerta abierta de la misma para que puede estar en cualquiera de los 2 ambientes de la misma (ambiente blando y ambiente con trazos de líneas horizontales negras y suelo rugoso) para después de media hora recopilar los datos y meterlos en el programa MUX_XYZ16L de la empresa Cibertec. S.A. y determinar el ambiente de preferencia. En ésta fase no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

En la segunda fase, el *condicionamiento* lo realizamos en 3 días, donde aplicamos la disolución salina 9gr/l (vehículo) de forma intraperitoneal por la mañana. Y en la segunda sesión por la tarde administraremos el fármaco (metilfenidato 1mg/kg, por vía intraperitoneal), en la plaza que no prefirió el primer día, al grupo experimental o el vehículo (al grupo control) y lo soltaremos en el ambiente que queremos que se adapte ya que este fue en el que estuvo menos tiempo durante el pretest, así los 3 días.

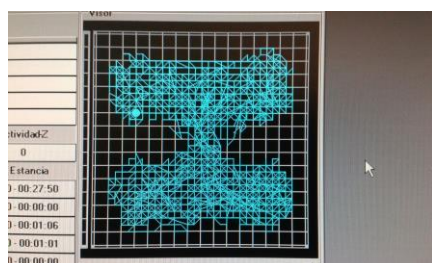
En la tercera fase (el quinto día) se realiza el *test* definitivo del estudio que consiste en tener la caja con la puerta abierta y soltamos al ratón en ella durante 30 minutos, en este caso sin administrarle ninguna solución. Se verá la preferencia de éste de un ambiente u otro mediante los sensores infrarrojo.

Luego de lo mencionado anteriormente realizamos el análisis de datos, escogimos el segundo método (Ver metodología), para evaluar a nuestros sujetos de estudio, animales clonidina (CLO).

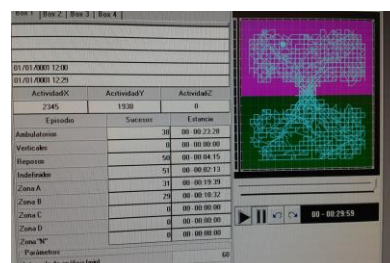
Éste modelo, se basa en el incremento de estancia: Tiempo (en segundos) de estancia en el ambiente pareado durante el test – tiempo (en segundos) de estancia en el ambiente pareado durante el pretest. (Para que se produzca dicho condicionamiento debido al fármaco el resultado debe ser positivo ya que el tiempo del test debe ser mayor que el pretest). Este modelo

Resultados

nos sirvió de referencia para el estudio para la preferencia de plaza (Tilley y Gu, de 2008).



A. Tiempo (s) en el Pretest



B. Tiempo (s) Test

Figura 4.18

Gráficos que demuestran el actímetro adaptado en compartimentos para estudiar la preferencia de plaza, Observamos en A, la gráfica del registro del actímetro utilizado para ésta prueba, donde se muestra el tiempo y el movimiento que realizaron los ratones de estudio clonidina (CLO), durante el pretest y en B se muestra el tiempo en segundos y el registro del movimiento de los ratones clonidina (CLO) durante el Test en sí. Se observa preferencia de lugar, pues pasa 20 minutos en la "zona A", por unos 10 minutos en la "zona B".

Como se puede ver en la fig. 4.19, se observa que con respecto a la disolución salina 9gr/l (vehículo) el grupo WT presenta respuesta de condicionamiento de preferencia de plaza tras aplicarle el medicamento (metilfenidato 1mg/kg). Los del grupo clonidina también presentan preferencia de plaza, sin que hayan diferencias con respecto al grupo control WT, ya que no resulta significativa ($P=0,7955$).

Realizando el análisis de datos dentro del grupo control WT (WT Vehículo y el WT con el Metilfenidato se obtuvo un $p= 0,023$) y dentro del grupo clonidina (Clonidina vehículo y clonidina con metilfenidato se obtuvo un $p= 0,050$), resultando en ambos casos estadísticamente significativo.

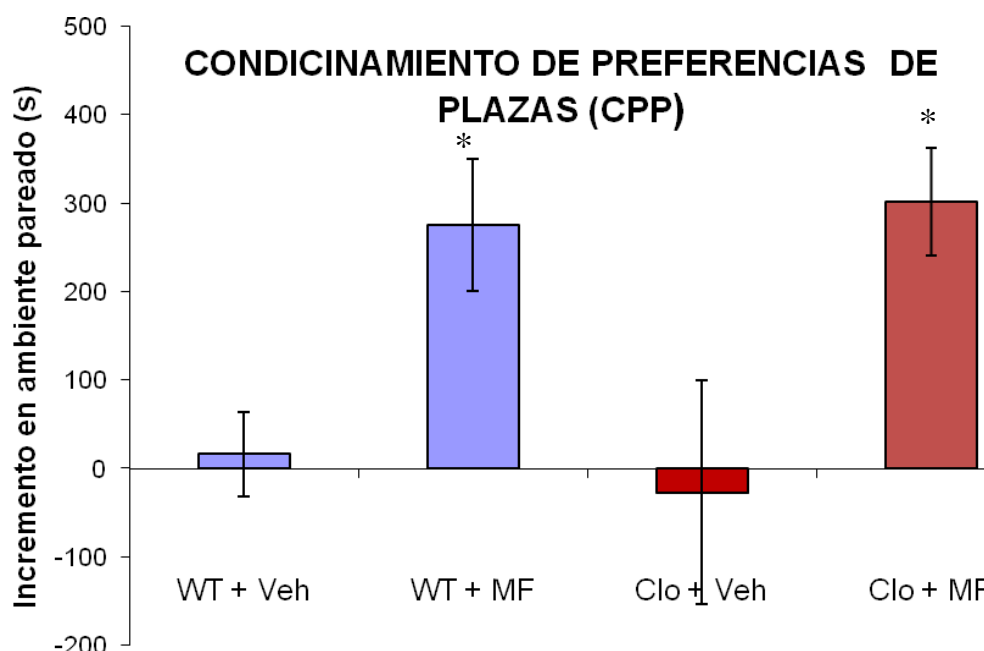


Figura 4.19

Condicionamiento de Preferencia de Plaza según el modelo de incremento de estancia:

Tiempo durante el Test menos el tiempo en el pretest medido en segundos. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control con vehículo (disolución salina)(WT+Veh) y el grupo control con metilfenidato(WT+MF) $p=0,023$ y también en el grupo clonidina se encontraron diferencias significativas entre el clonidina con disolución salina (Clo+Veh) y el clonidina con metilfenidato (CLO+ MF), $p=0,05$; $p<0,05$. No se encontraron diferencia significativas al compara el grupo control metilfenidato (WT+MF) y el clonidina metilfenidato(Clo+Mf), $p<0,05$.

4.4.3. Prueba de Etanol

Para evaluar la relación de clonidina y etanol se utilizó ésta prueba siguiendo los estudios (Bahi, Amine et al., 2012, 2013); donde indican que los ratones al aplicarle un fármaco que afecta al sistema noradrenérgico como en nuestro caso la clonidina, éstos sujetos presentan ansiedad y tienden al aumento del consumo a medida que va pasando las sesiones.

Como se puede observar al mediar la ingesta total de líquidos(sumando la ingesta diaria del bote de etanol y la del agua), se puede ver que los ratones clonidina bebieron más líquido con etanol, que los del grupo WT, a las

Resultados

concentraciones de 5%($p=0,004$), 10%($p=0,039$) y 20%($p=0,034$); resultando éstas diferencias estadísticamente significativas $p<0,05$. (Fig. 4.20).

Sin embargo, al evaluar la preferencia del grupo clonidina por el bote con etanol y el del bote con agua, no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo WT ($p<0,001$). Solo en la sesión al 20% de Etanol se observa un ligero aumento por parte de los animales de estudio, pero no significativa ($p=0,087$). (fig. 4.21).

Al calcular la ingesta diaria de etanol, por los ratones del grupo clonidina, se observó que ésta era superior a la del grupo WT en las concentraciones del 10% y del 20% resultando estadísticamente significativas ($p=0,039$ y $p=0,038$; $p<0,05$) (fig. 4.22).

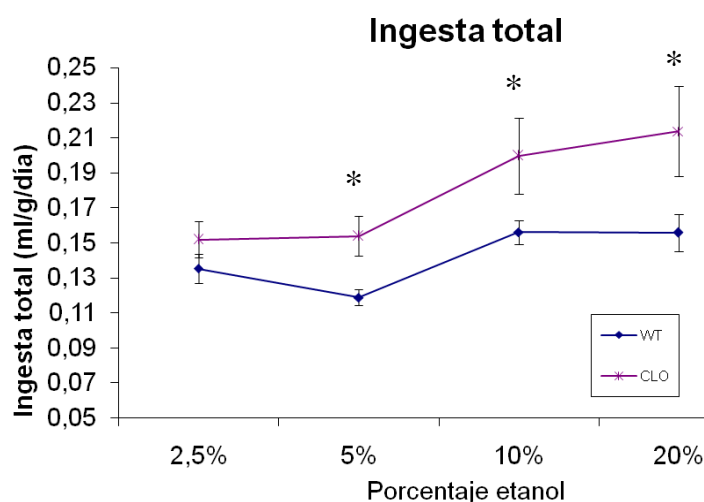


Figura 4.20: Ingesta Total del líquido (Agua+Etanol)

Donde se observa que a medida que pasaban los días y se daba el aumento de alcohol el consumo se incrementaba en el grupo clonidina (CLO) en comparación al grupo control (WT), observándose diferencias significativas en la sesión al 5%, 10% y 20%. ($p<0,05$).

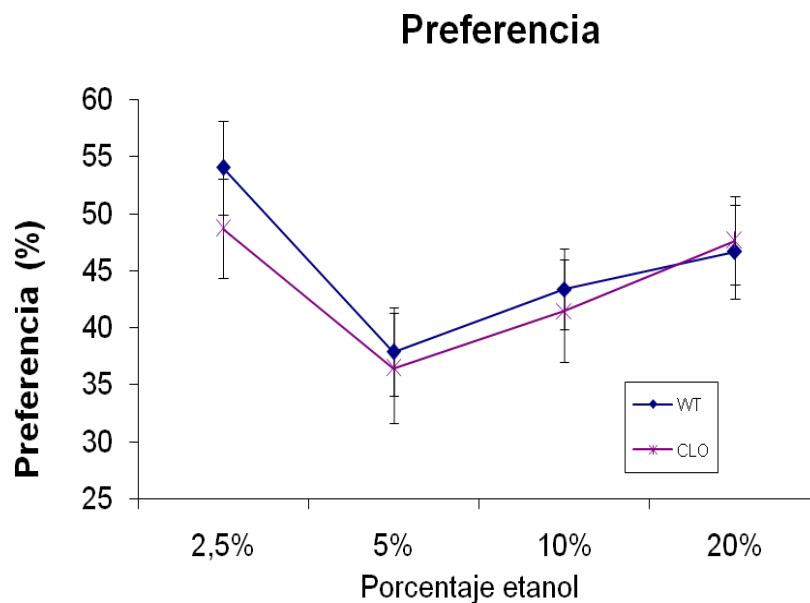


Figura 4.21: Preferencia de Etanol

En ésta gráfica se observa la preferencia del Etanol en ambos grupos con respecto al consumo de agua. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, solo en el consumo al 20% se observa un ligero incremento de parte del grupo de estudio (CLO) ($p=0,087$), no significativo.

Al evaluar la cantidad total de etanol ingerida diariamente por los ratones del grupo clonidina, se observó que ésta era superior a la del grupo WT a la concentración de 20% (fig. 4.21).

Resultados

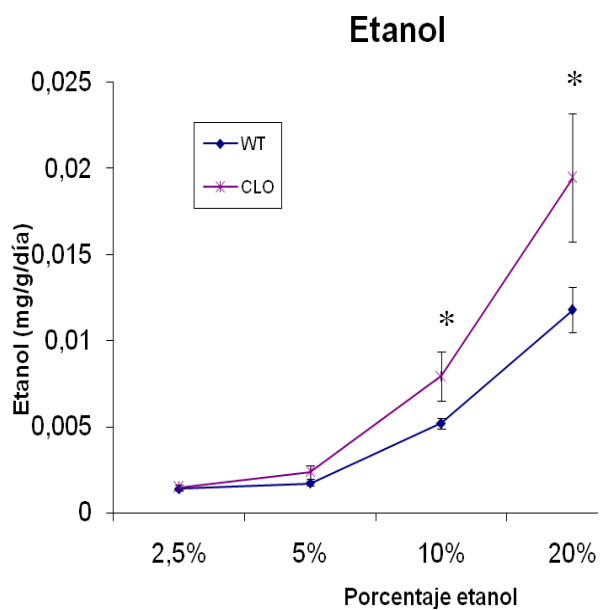


Figura 4.22: Ingenta diaria de Etanol y agua

Al evaluar la cantidad total de etanol ingerida diariamente por los ratones del grupo clonidina, se observó que ésta era superior a la del grupo WT en las concentraciones del 10% y 20% ($p=0,039$ y $p=0,038$ respectivamente, $p<0,05$), resultando estadísticamente significativas

5. DISCUSSION

El aprendizaje asociativo no es aleatorio pero está limitado por la biología del organismo, los animales en general aprenden a asociar los estímulos que son importantes para su supervivencia. El cerebro no es una tabla rasa, es capaz de percibir algunos estímulos y no otros. Puede diferenciar algunas relaciones entre las cosas en el medio y no otras. Las presiones de la evolución han predispuesto a los cerebros de diferentes especies a relacionar ciertos estímulos o, en un cierto estímulo y un comportamiento, mucho más fácilmente que otros. Los factores genéticos y los de las experiencias pueden también modificar la eficacia de un reforzador en una especie. Los resultados obtenidos con un tipo particular de reforzador varían enormemente entre las especies y entre los individuos dentro de las especies, en especial en los seres humanos.

El LC, por su parte, recibe aferencias de muchas o posiblemente todas las modalidades sensoriales de la periferia. Las principales aferencias que recibe el LC proceden del núcleo paraventricular (NPV) localizado en el hipotálamo. Su importancia recae en la respuesta hormonal al estrés. Cabe destacar que neuronas del LC son activadas por la hormona *adrenocorticotropa*, u hormona liberadora de corticotropina, (CRH) que media la respuesta a ciertos factores asociados al estrés como puede ser la hipotensión (Valentino y otros, 1993).

Existen conexiones recíprocas entre este núcleo paraventricular y el LC que conforma una vía de control hipovolémico. También existen otras aferencias desde varios núcleos del troncoencéfalo como pueden ser el núcleo del rafe dorsal (NRD) y el núcleo del rafe medial (NRM) que lo relacionan con el dolor (revisado en Valenzuela-Harrington, 2007). La vía más importante del dolor es el tracto espinotalámico (STT) que cuando contacta con el LC, lo activa y éste induce una descarga de NA que provoca un aumento de la ansiedad y de la vigilia.

El LC también tiene aferencias importantes desde otros dos núcleos del tronco encéfalo, el Núcleo Paragigantocelular (PGi) y el Núcleo Prepositus Hipoglosi (PrH). Son dos clases de aferencias con sus respectivos grupos de neuronas: aferencias excitatorias que median actividad evocada sensorialmente

y aferencias tónicamente inhibitorias según el estado de alerta y la conducta del momento.

En cuanto a procesos de aprendizaje y la memoria también juega un papel clave. Existen proyecciones ascendentes del LC del tracto noradrenérgico dorsal (TNAD) que ejercen función en la modulación de la atención y memoria. Este TNAD está relacionado con el procesamiento de la información ante una situación nueva o que requiera atención (revisado en Valenzuela 2007). La hiperactividad del LC interrumpe actividades automáticas que son incompatibles con respuestas conductuales que requieren un alto grado de alerta e interacción con estímulos ambientales.

La hipo o hiper función del LC influye sobre la actividad sensorial y motora, favoreciendo respectivamente a programas conductuales automáticos, o respuestas a estímulos ambientales relevantes. La liberación de noradrenalina por factores de atención, ciclo vigilia o sueño parece ser esencial para el aprendizaje y es responsable de la consolidación de la memoria (Gibbs, 2000).

Debido a la temprana ontogenia del sistema noradrenérgico, también ha llevado a pensar que este sistema ejerce las funciones de regulación en el desarrollo de la corteza. Numerosos estudios han documentado su papel en los procesos de desarrollo y en el mantenimiento de la plasticidad cortical (Blue y Parnavelas, 1982; Bear y Singer, 1986; Lidow y Rakic, 1994; Osterheld-Haas et al., 1994). La fuerte expresión de los receptores adrenérgicos durante la corticogénesis también ha llevado a la hipótesis de que estos receptores están implicados en diferentes procesos de desarrollo, incluyendo la migración neuronal (Wang y Lidow, 1997) (Andrews y Parnavelas, 2012).

Durante el desarrollo postnatal se produce una maduración funcional que afecta a numerosas estructuras del tronco del encéfalo. Entre ellas destacamos la maduración del sistema noradrenérgico a nivel del puente. En esta etapa, crítica para el desarrollo conductual y neuroendocrino, los receptores adrenérgicos α_2 alcanzan los valores máximos de expresión en el tronco del encéfalo (Happe et al., 1999; Iushkova y Dygalo, 1995) y se han propuesto como posibles reguladores de procesos durante el desarrollo (Dygalo et al., 2000;

Happe et al., 2004). La manipulación neonatal de dichos receptores en la zona del puente ha demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina et al., 2001; Shishkina et al., 2002; Shishkina et al., 2004).

Según el estudio de Dygalo et al., (2004), la densidad de receptores adrenérgicos α_2 muestra un pico durante la primera semana de vida en ratas. Sin embargo, en la corteza la densidad de estos receptores es menor. En adultos el aumento no se produce y la densidad de estos receptores es mucho menor (Mansouri et al., 2001). Esto permite a distintos agonistas y antagonistas de estos receptores tener efectos específicos en el desarrollo de la estructura cerebral.

Existen distintos fármacos que actúan sobre dichos receptores, actuando como agonistas o antagonistas. Un compuesto agonista de un receptor α_2 es aquel que actúa sobre dicho receptor, activando y estimulando la respuesta del receptor en cuestión, produciendo una disminución en los niveles de AMPc. Siendo éste mayoritariamente presináptico, cabe recordar que el efecto será inhibitorio. Por el contrario, un antagonista α_2 será aquella sustancia que bloquea al receptor, inactivando su función. Uno de los lugares de acción de los receptores α_2 es el Locus coeruleus. Aquí, como hemos mencionado, su efecto es el de controlar la liberación de noradrenalina.

La clonidina es un ejemplo de fármaco **agonista** α_2 . Administrada por vía sistémica tiene efectos tanto centrales como periféricos y, administrados por vía intratecal o epidural, puede aumentar de forma espectacular la duración del bloqueo y producir un efecto analgésico aditivo. El modelo animal que hemos empleado en el presente trabajo ha pretendido abordar el papel que juega el sistema noradrenérgico del tronco del encéfalo modificando, en distinto grado, su actividad. De este modo, en el ratón modelo tratado con clonidina se ha bloqueado la actividad de las neuronas del LC actuando sobre los receptores presinápticos α_2 .

Las neuronas del Locus coeruleus son el principal aporte de noradrenalina en el Sistema nervioso central. Estas neuronas noradrenérgicas están

implicadas en procesos como el aprendizaje, respuesta, atención y ansiedad. En situaciones de estrés estas neuronas se activan, aumentando de este modo la liberación terminal de noradrenalina, con lo que se facilita la atención y la vigilancia. Cualquier alteración durante el desarrollo del individuo durante la etapa postnatal puede provocar efectos sobre distintos sistemas en los que el LC interviene, al producir variaciones en la concentración de noradrenalina liberada y pudiendo afectar a la sinaptogénesis y al mantenimiento de las nuevas sinapsis.

En cuanto a las pruebas relacionadas con el desarrollo fisiológico y sus marcadores, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran como el grupo tratado postnatalmente con clonidina presentó un retraso generalizado en el desarrollo postnatal, tanto en el primer día de realización de las pruebas como en la aparición de los marcadores de desarrollo. No existen indicios que demuestren que este retraso en los marcadores se deba a un efecto en la maduración del sistema nervioso central. Se podría explicar, más bien, a un efecto del fármaco sobre los receptores α -adrenérgicos periféricos. Esto demuestra que el sistema noradrenérgico central no juega ningún papel en el desarrollo de estos marcadores externos, siendo el retraso encontrado en el grupo tratado con clonidina consecuencia de la administración sistémica del fármaco.

Tras la descripción de conceptos principales y de los resultados de las investigaciones que antecedieron, pasaremos a discutir los aspectos más relevantes de nuestros resultados, evaluando los efectos producidos por las distintas alteraciones realizadas en el sistema noradrenérgico. A simple vista, buscando las consecuencias fisiológicas que presentan los ratones a los que se les administró el fármaco clonidina, se demuestra que el tratamiento no tuvo efecto alguno en la supervivencia de éstos. En una visión global de los resultados, se puede concluir que la reducción de la liberación de noradrenalina por el tratamiento postnatal con clonidina provoca serias alteraciones en los sistemas fisiológicos, que se refleja en un retraso en el desarrollo (Calvino-Núñez y Dominguez del toro, 2014), una mayor aparición de episodios de hiperapnea y alteraciones en las pruebas de sensibilidad, respuestas motoras,

atención, memoria (MCP y MLP) y aprendizaje asociativo entre otros. Y actualmente nos encontramos estudiando la respuesta social del ratón clonidina, así como de otros ratones modelos y su tendencia a la dependencia de etanol.

5.1 Participación del sistema noradrenérgico en la analgesia:

Como se ha mencionado anteriormente en distintos experimentos realizados en ratas, se ha demostrado que las neuronas del Locus coeruleus son activadas por la estimulación directa de fibras C sensitivas de los nervios periféricos. Éstas transportan aferencias relacionadas con estímulos dolorosos, temperatura y mecanorrecepción de bajo umbral y tendrían así la función de incrementar el estado de alerta y la atención. El LC podría también formar parte del mecanismo central de control del dolor. En ratas, la analgesia, considerada como un mayor tiempo de latencia entre el estímulo doloroso y un movimiento reflejo, es producida por estimulación química o eléctrica del LC. La analgesia así obtenida es bloqueada por la administración intratecal a nivel del tronco del encéfalo de antagonistas α_2 adrenérgicos (phentolamin, yohimbina), indicando que la analgesia inducida por el LC estaría mediada por un sistema noradrenérgico descendente.

Por otro lado, en estudios realizados para comprobar el papel de la noradrenalina en la nocicepción (Willis et al., 2004), se demostró que ésta actúa como antinociceptivo. Así, en trabajos posteriores realizados por Warnecke et al., 2005, se observó que los ratones homocigotos EAR2, que tenían un menor número de neuronas en el Locus coeruleus, tenían la tendencia de lamerse las patas antes que los sujetos silvestres, en la prueba de la placa caliente, mostrando así una sensibilidad mayor.

En nuestro estudio, los ratones adultos clonidina machos mostraron una menor latencia en lamerse las patas en la prueba de la placa caliente que los ratones silvestres, coincidiendo con los estudios anteriormente mencionados. Así, la reducción de neuronas en el Locus coeruleus, producida por el fármaco, disminuye la secreción de noradrenalina, la cual, como hemos dicho anteriormente funciona como antinociceptivo. Como consecuencia, se aumentó la sensibilidad de los ratones clonidina. Llama la atención que para los ratones neonatos, los resultados difieren con los obtenidos en los adultos (Grupo Domínguez del Toro). Así, los ratones con una reducción de la secreción de

noradrenalina debido al tratamiento con clonidina, presentaron una sensibilidad mayor que los ratones control, por lo que la reducción de noradrenalina por el fármaco no disminuyó, en este caso, la sensibilidad de los animales. A pesar de uso como anestésico de la clonidina, (se usa incluso como anestésico local en niños (Ansermino y otros, 2003)) sería lógico observar el efecto analgésico (sobre la latencia T1) que tiene el grupo tratado con clonidina sobre el control. Sin embargo, esto no ocurre así, obteniendo una latencia mayor, lamiéndose las patas en un tiempo superior a éstos. Estos resultados se contraponen con los obtenidos para los mutantes, confirmarían la estudios anteriores (Willis et al., 2004; Warnecke et al., 2005). En referencia a la respuesta de huída (T2), como respuesta comportamental al dolor, los animales tratados con clonidina. En este caso resulta más difícil encontrar una explicación, se podría argumentar que la situación de dolor cree ansiedad en los animales, mayor en los tratados que en los control, y confirmaría los estudios obtenidos por Mirmiran et al., (1985), ya que ellos hacen referencia a casos de hiperansiedad tras el tratamiento crónico con clonidina, en ratas adultos. Contrario a los resultados obtenidos para los clonidina adultos, así como en los neonatos tardaron más en escapar de la placa caliente que los ratones silvestres. Esto se podría explicar como una mayor ansiedad producida por la prueba, que les impidió reaccionar, en el caso de los ratones clonidina adultos, que presentaron una mayor sensibilidad al dolor (hipersensibilidad e hiperrreactividad). Por lo que se corrobora así la diferencia en el sistema noradrenérgico de los ratones neonatos y los adultos. (Grupo Domínguez del Toro)

Además de las diferencias entre el sistema noradrenérgico según la edad del animal, se suma también que en el grupo de los neonatos no se hizo diferencias entre sexos. La prueba de la placa caliente de los animales adultos se realizó a ratones de ambos sexos, mientras que en neonatos no. En los estudios realizados por Sternberg et al., (2004), se ha observado que existe diferencia entre sexos para la nocicepción, incluso en la primera semana de vida. Así, los sujetos hembras recién nacidos tienen una latencia mayor de permanencia en la placa caliente que los animales machos. Nuestro estudio confirmaría lo mencionado.

5.2. Participación del sistema noradrenérgico en la actividad exploratoria y motora:

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que todos los dos grupos experimentales (WT y CLO), fueron incrementando su actividad acumulada en la prueba del actímetro.

Distintos experimentos preliminares realizados por nuestro grupo, han demostrado que al tratar con metilfenidato, un fármaco que inhibe la recaptación de dopamina y noradrenalina, a los ratones tratados embrionariamente con ácido retinoico, reducen su actividad en la prueba del campo abierto.

En el presente estudio los animales tratados con clonidina machos adultos, mostraron una hiperactividad e hiperansiedad, con respecto al grupo control. Estos resultados confirmarían los resultados obtenidos por Mirmiran et al., (1985) que referían un cuadro de hiperansiedad e hiperactividad tras el tratamiento postnatal con clonidina. Es posible que la prueba del actímetro no sea suficiente para separar ambas conductas, ya que los clonidina hembra demostraron ser hipoactivas, dato que a su vez, sería lógico obtener porque la clonidina es usada como sedante (Ansermino et al., 2003). Además de la actividad acumulada, otra de las variables estudiadas en la prueba de campo abierto fue la actividad mostrada en el centro del actímetro. Esta variable se utilizó como medida de la ansiedad en los ratones, existiendo diferencias estadísticamente significativas. Como ya hemos dicho anteriormente, los estudios de Mirmiran (1985) exponen casos de hiperansiedad en adultos tras el tratamiento crónico con clonidina. Sin embargo, puede ser que ésta prueba no sea suficiente para medir la ansiedad del animal, siendo acertado completarlo con otro tipo de pruebas de estrés y ansiedad. Estos resultados estarían acorde con los obtenidos por Samuels y Szabadi (2008), en los que se reducía la ansiedad de los animales tras la inactivación del Locus coeruleus. Se repite por lo tanto una diferencia entre la función del sistema adrenérgico de los ratones neonatos y de los adultos. (Grupo Domínguez del Toro)

5.3. Participación del sistema noradrenérgico en la memoria y aprendizaje asociativo:

Las distintas alteraciones provocadas en el sistema noradrenérgico provocan una reducción en la exploración de los objetos novedosos. El hipocampo es una de las estructuras relacionadas con la memoria más estudiada a día de hoy. Distintos estudios señalan al Locus coeruleus como la única fuente de noradrenalina a las neuronas del hipocampo (Fu et al., 1999; Kiernan, 2005; Lindvall y Stenevi, 1978; Loughlin, 1986; Nieuwenhuys, 1985; Pasquier y Reinoso-Suarez, 1978; Ungerstedt, 1971). El hipocampo es una estructura límbica centrada principalmente en la formación de la memoria declarativa, por lo que las distintas proyecciones entre el Locus coeruleus y el hipocampo pueden contribuir a la formación de la memoria. En experimentos realizados por Sullivan et al., (1994) mostraban como ratas recién nacidas con lesiones en el Locus coeruleus presentaban una deficiencia en el aprendizaje olfativo.

De la misma manera, otro estudio realizado por el grupo de José María Delgado, mostró que durante el reconocimiento de objetos también se producía potenciación de la sinapsis CA3 – CA1 del hipocampo (Clarke et al., 2010). Así, en nuestro estudio quisimos ver la relación de las distintas alteraciones en el sistema noradrenérgico y su relación con el hipocampo y la memoria declarativa a partir de la prueba del reconocimiento de objetos.

En los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede observar que en ambos grupos clonidina (machos y hembras) en los que se vio afectado el sistema noradrenérgico de distintas formas, presentaron una menor exploración del objeto novedoso en comparación con el grupo control, mostrando así una deficiencia en la memoria y el aprendizaje asociativo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas, por lo que sólo podríamos hablar de tendencias. Los animales clonidina presentaron una exploración del objeto novedoso menor a la mostrada en la sesión de entrenamiento. Esto significaría que exploró menos el objeto nuevo. Estos resultados se diferenciaron de los

obtenidos para los sujetos control, que mostraron, lógicamente, una mayor exploración por el objeto novedoso en la sesión de memoria a corto plazo, y por lo tanto, identificaron el nuevo objeto desconocido colocado en la caja. Estos datos se repitieron en aquellos animales neonatos con una reducción de noradrenalina, posiblemente por el tratamiento postnatal con clonidina. (Calvino-Núñez y Domínguez del Toro 2014) No obstante, quisimos ir un poco más allá y estudiar qué ocurría con la memoria a largo plazo (MLP), si ésta también se veía afectada por la reducción de noradrenalina. Y efectivamente los sujetos clonidina continúan presentando menor respuesta de MLP, que los sujetos control. Funcionalmente, se han descrito modificaciones en estructuras corticales (hipocampo) que pueden afectar a la capacidad de retención, cuando se interfiere durante el desarrollo postnatal en la neurotransmisión noradrenérgica, con un tratamiento crónico con clonidina (Gorter et al., 1989; Jentsch y Anzivino, 2004) o con la exposición a ácido retinoico en los días de gestación (E8-E10 en ratas) (Holson et al., 1997), por ejemplo, produciendo daños en el aprendizaje. A modo general, podríamos decir que nuestros resultados concuerdan con los distintos estudios mencionados anteriormente, en los que las distintas proyecciones entre el hipocampo y el Locus coeruleus, como principal aporte de noradrenalina, son necesarios para el establecimiento y la recuperación de la memoria.

La Clonidina impide el aprendizaje ante un estímulo aversivo en ratones adultos. La amígdala es la principal responsable de las respuestas de miedo y ansiedad ante estímulos ambientales amenazadores. Al igual que ocurría con el hipocampo, el Locus coeruleus tiene un gran número de proyecciones con la amígdala, en particular a los núcleos basal y central. La activación del LC por la estimulación eléctrica o por la administración de distintos fármacos, como la yohimbina (antagonista de los receptores adrenérgicos α_2) provoca un aumento en la ansiedad. Además de en la ansiedad, las distintas proyecciones del LC a la amígdala también juegan un papel importante en la formación y recuperación de memorias emocionales (Samuels and E. Szabadi, 2008). De acuerdo con estos resultados, diversos estudios llevados a cabo por Roozendaal et al., (2008), proponen que la noradrenalina liberada en la amígdala basolateral favorece la memoria.

Los resultados obtenidos tras nuestro estudio están acorde con los trabajos anteriormente mencionados. Ya que los animales clonidina, los cuales tienen una reducción en la secreción de noradrenalina, tienen dificultades en la realización de la prueba de la evitación pasiva, que está relacionada directamente con la estructura de la amígdala. Los animales silvestres, al recibir la descarga tras la primera entrada en la cámara oscura, no volvieron a entrar en ninguna de las sesiones posteriores. Sin embargo, los grupos clonidina siguieron entrando en las sesiones para evaluar la memoria a corto y largo plazo. El grupo no mejoró sus resultados de latencia de entrada en las dos últimas sesiones. Así, en estos animales, la cantidad de noradrenalina parece proporcional a la memoria emocional, representada por la amígdala. La liberación de noradrenalina por factores de atención, parece ser esencial para el aprendizaje y es responsable de la consolidación de la memoria (Gibbs, 2000).

En distintos experimentos realizados por Adams y Geyer (1981) se observó que una lesión bilateral en el Locus coeruleus en ratas, reducía la magnitud de la reacción de respuesta a un estímulo con aire. Estos estudios fueron ampliados posteriormente por Tsuruoka et al., (2010), en los que, además de confirmar que el Locus coeruleus y Locus subcoeruleus ejercían una influencia excitatoria en la respuesta de sobresalto a un estímulo de aire, analizaron el periodo DIP. Este periodo DIP es una postura inmóvil, de defensa, de una latencia de 2 a 5 segundos, que acompaña a la respuesta de sobresalto, pero es independiente. Este periodo también disminuyó en las ratas con un daño en el LC y SC. Si se activaban estas estructuras durante el DIP, se producía una influencia inhibitoria en mecanismos sensoriales en el cerebro y la médula espinal. Es decir, el animal se concentraba en las circunstancias, inhibiendo información sensorial innecesaria, para extraer otra información sensorial necesaria para la supervivencia. Asimismo, otros estudios (Shishkina et al., 2003, 2004) demostraron que la interferencia con la expresión postnatal de los receptores α_2 en el tronco del encéfalo, disminuía la intensidad de la respuesta de sobresalto en ratas adultas. En nuestro caso, el ratón clonidina presentó una mayor intensidad y latencia la respuesta de sobresalto en la línea base (VMP), comparado con el ratón control. Esta reducción en la intensidad no afectó la latencia de la respuesta. Que no confirmaría lo estudios anteriores donde el

Discusión

Locus coeruleus modula el comportamiento de sensibilidad a entradas sensoriales, participando así en la respuesta de sobresalto. De ello se deduce que la maduración postnatal de la señalización noradrenérgica, y con ella la actividad de las neuronas del LC, participa en la respuesta de sobresalto.

En la inhibición por prepulso, el clonidina presentó una inhibición menor en la intensidad (VMP), a penas afectando la latencia al pico máximo y no alterando la latencia de respuesta. Estos resultados no coinciden con distintos estudios realizados por Hoffman e Ison (1980) y Takeuchi et al., (2001), que sugieren que las alteraciones en la inhibición por prepulso podrían deberse a déficits en la integración motosensorial a nivel del tronco cerebral o de su modulación por parte del cerebelo (López-Ramos y otros, 2010; Porras-García y otros, 2005).

En lo referente al estudio del sistema auditivo, con la prueba de la estimulación sonora (respuesta de sobresalto), nuestro estudio demuestra que la interferencia con el sistema noradrenérgico durante el desarrollo postnatal afecta a la respuesta de sobresalto, como se ha descrito con anterioridad (Shishkina et al., 2001; Shishkina et al., 2002; Shishkina et al., 2004).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el hipocampo es la estructura cerebral más estudiada por su participación en los procesos de aprendizaje y memoria. Numerosos trabajos relacionan el aprendizaje asociativo con esta estructura (Gruart, et al, 2006; Madroñal y otros, 2007). Por otro lado, en estudios realizados para comprobar el papel del hipocampo en el condicionamiento operante (Corbit y Balleine 2000), se demostró que los animales podían adquirir la tarea instrumental aún sin el hipocampo. No obstante, se piensa que los animales con lesiones en el hipocampo tienen dificultades para realizar asociaciones entre el contexto estimular y una consecuencia (Jarrard, 1995; Corbit y Balleine, 2000; Cheung y Cadinal, 2005). Estudios recientes (Jurado-Parras, 2012), proponen que el hipocampo no es imprescindible para la adquisición de ciertos aprendizaje asociativos, como es el condicionamiento instrumental; al menos, no de la misma manera que para la adquisición del condicionamiento clásico. Estos estudios proponen la implicación de otras vías durante el condicionamiento operante, como la vía tálamo – corteza

prefrontal medial (Herry et al., 1999), amígdala – corteza prefrontal medial (Maroun y Richter-Levin, 2003) y/o la vía corteza somatosensorial – corteza prefrontal medial (Gemmell y O'Mara, 2000), además de cierta implicación del hipocampo, ya que como se ha comentado anteriormente, aquellos animales con una lesión en el hipocampo presentaron dificultades en la ejecución de la tarea operante. El hipocampo está relacionado con el aprendizaje de la asociación contexto-refuerzo (Corbit y Balleine, 2000). Nuestros resultados, por lo tanto, coinciden en parte con los estudios mencionados anteriormente, ya que al limitar la proyección noradrenérgica, el hipocampo se ve afectado, presentando así dificultades para realizar asociaciones entre el contexto estimular y una consecuencia (Jarrard, 1995; Corbit y Balleine, 2000; Cheung y Cadinal, 2005). Estos datos a su vez, concuerdan con los resultados obtenidos para la prueba del reconocimiento de objetos, donde los clonidina mostraron una deficiencia en la identificación del objeto novedoso. Por lo que podríamos decir que además del hipocampo, para el condicionamiento instrumental, están implicadas otras vías independientes de la noradrenalina, las cuales se ven afectadas en el clonidina, y son complementarias a las vías noradrenérgicas. El cerebelo y el núcleo amigdalino participan en ciertas formas de memoria implícita. Las lesiones de varias regiones del cerebro, que son importante para tipos implícitos de aprendizaje, afectan a las respuestas condicionadas clásicas simples. El caso mejor estudiado es el condicionamiento clásico del reflejo palpebral protector en los conejos. En nuestra investigación obtuvimos como resultado que los ratones clonidina no realizan la asociación entre R1 y R2, y casi nula anticipación. Resultando significativa estadísticamente, que confirmaría la hipótesis de que la aplicación de clonidina en la etapa neonatal no permite que se formen las conexiones necesarias del sistema adrenérgico, resultado que confirmaría investigaciones similares mencionadas anteriormente.

5.4 La clonidina afecta la respuesta o comportamiento social y acentúa la tendencia a la adicción:

La prueba del intruso revela el comportamiento de los ratones en situaciones sociales de invasión del territorio. Los ratones clonidina presentan un comportamiento de olor más retrasado que el grupo control, el primer día, La prueba del intruso revela el comportamiento de los ratones en situaciones sociales de invasión del territorio. Se ha encontrado una diferencia significativa en lo referente a la conducta copulativa, siendo menor en los clonidina en comparación al control. Este resultado corrobora el obtenido en un estudio similar realizado en ratas (Mirmiran y col., 1985).

Actualmente hay consenso en admitir que la adicción, a nivel cerebral, es el producto de desregulaciones progresivas y de múltiples cambios fisiopatológicos en muchas estructuras y sistemas cerebrales, no solo del sistema dopaminérgico mesolímbico. Así, el circuito estriato-palidal-talámico participa en la transición de la motivación a la acción (Kelley, 2004; Mogenson *et al*, 1980), mientras que la corteza prefrontal tiene un papel importante en la autorregulación del comportamiento y su patología en los problemas de autocontrol (Arnsten y Li, 2005; Dalley *et al*, 2004; Miller y Cohen, 2001). Por otra parte, un aspecto primordial en la emoción y la motivación depende de la valoración de los estímulos ambientales externos. En esta valoración dependen áreas cerebrales interconectadas como la amígdala, el estriado ventral y la corteza prefrontal (Cardinal *et al*, 2002). Además, los circuitos cerebrales del estrés están implicados en la vulnerabilidad inicial a las drogas de abuso, el refuerzo negativo asociado con la abstinencia -tanto aguda como tardía y la recaída inducida por estrés (Goeders, 1997; Kreek y Koob, 1998; Piazza *et al*, 1996; Piazza y Le Moal, 1997, 1998).

El acetaldehído, un producto del metabolismo del etanol, parece combinarse con ciertas proteínas comportándose como un falso neurotransmisor que interfiere en el estímulo excitador del SNC motivando la supresión crónica de la misma. En respuesta, el cerebro aumenta la síntesis de neurotransmisores

como la norepinefrina, serotonina y dopamina. Esto explicaría la clínica del síndrome de abstinencia alcohólica en el que predominarían los efectos adrenérgicos centrales produciendo síntomas característicos como delirium, alucinaciones, midriasis, temblor, convulsiones, taquicardia, hipertensión e hiperventilación. En este sentido se han detectado niveles elevados de catecolaminas y sus metabolitos en plasma y orina durante el síndrome de abstinencia. El alcohol disminuye la actividad del locus coeruleus donde los receptores han demostrado su relación con la dependencia alcohólica revertida experimentalmente con Yohimbina (alfa2 antagonista) y con éxito terapéutico en el síndrome de abstinencia con clonidina (alfa2 agonista). Para nuestro estudio realizamos la evaluación con la prueba de etanol, para evaluar nivel de consumo de los ratones clonidina y compararlo con otros modelos de ratones investigados por el grupo, obtuvimos que los clonidina tienden a presentar un mayor consumo que los del grupo control. De este modo, si tenemos en cuenta el consumo total de líquidos, los ratones tratados con clonidina presentan un incremento significativo en dicho consumo, achacable al consumo mayor de agua. De hecho, existen datos que apoyan que el sistema noradrenérgico central controla la ingesta de agua (Gasparini y cols., 2009). Sin embargo en el consumo total de etanol se observa una tendencia a consumir más miligramos en los dos grupos tratados con clonidina, lo que confirma los datos ya obtenidos anteriormente en modelos similares en ratas (Mirmiran y cols., 1985).

Con respecto a la preferencia de plaza, el caso de los 2 grupos estudiados, el de Silvestres Metilfenidato y Clonidina Metilfenidato, muestran un incremento de tiempo en el ambiente deseado en el test con respecto al pretest llegando a ser un condicionamiento significativo en ambos casos. Por lo tanto, podemos decir que ambos grupos se condicionaron bien al ambiente deseado tras el tratamiento con Metilfenidato, tal y como esperábamos a partir de evidencias de estudios anteriores (Griffin y cols., 2012; Tilley y Gu, 2008; Thanos y cols., 2009).

No hemos podido demostrar que los ratones tratados con clonidina tengan una mayor preferencia de plaza que los ratones silvestres, como cabría esperar si tenemos en cuenta que demostraban una mayor ingesta de etanol

(corroborando el estudio anterior de Mirmiran y cols (1985) realizado en ratas), lo que nos podría indicar que son más adictos y que los mecanismos de refuerzo deberían ser más consistentes.

Las lesiones o el mal funcionamiento del sistema noradrenérgico están implicadas también en diversos trastornos, como pueden ser la epilepsia, el Parkinson, el Alzheimer, la depresión o el estrés. Las lesiones en las neuronas del LC se han implicado en fenómenos de epilepsia y en la enfermedad de Parkinson. La pérdida parcial de neuronas del LC puede explicar la disminución del estado de alerta, la menor reacción a estímulos dolorosos y la alteración del ciclo circadiano de los enfermos de Alzheimer. Por otro lado el LC sería fundamental en gran parte de la respuesta del síndrome de abstinencia. El rol del LC en tal síndrome explicaría la efectividad del uso de clonidina (agonista de receptores α -adrenérgicos) en el tratamiento de la adicción a opiáceos. Se ha demostrado que durante el estrés aumenta la degradación de la noradrenalina en regiones cerebrales tales como la corteza y el hipocampo, para los cuales el LC es la única fuente de NA. Igualmente, la depresión podría asociarse con una hipofunción del LC. A partir de diversos estudios realizados con animales se ha propuesto también al LC como mediador de la ansiedad y sus manifestaciones conductuales. Sin embargo, en experimentos realizados con humanos no se ha llegado a la misma conclusión, por lo que esto sugiere que el LC en humanos, podría ocuparse del control del estado de alerta y aprendizaje y no estar implicado directamente en los fenómenos relacionados con la ansiedad. El hallazgo de que la clonidina, un agonista de los receptores adrenérgicos alfa2 y de imidazolina, tiene eficacia en el abandono del hábito de fumar sugiere que se justifica el trabajo adicional en esta área. Un aspecto clave de la investigación futura será si la eficacia de los fármacos que actúan por medio de estos mecanismos puede dissociarse de los efectos adversos. Tales mejoras en la relación beneficio/riesgo pueden permitir el uso de primera línea en una población amplia de fumadores.

En conjunto, los resultados obtenidos, parecen demostrar que el tratamiento postnatal con clonidina, que afecta funcionalmente al trabajo que realizan las neuronas del Locus coeruleus durante dicho periodo, está

afectando de manera significativa el modo en que el ratón adulto resuelve sus conflictos con el entorno y su relación con los objetos o situaciones que implican un proceso de aprendizaje. Este tratamiento viene a demostrar la gran importancia que el sistema noradrenérgico pontino tiene con respecto al establecimiento de conexiones funcionales con distintas regiones de la corteza. No obstante conviene ser cautos con el presenta razonamiento, pues está pendiente la ampliación de la *n* experimental, que nos haga estar seguro de los resultados y de las conclusiones obtenidas.

6. CONCLUSIONES

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en la influencia del desarrollo del sistema noradrenérgico y el papel del Locus coeruleus en el control del desarrollo postnatal de la analgesia, la actividad exploratoria, del aprendizaje y la memoria. Además del estudio del comportamiento social y la relación del etanol-clonidina.

De este estudio podemos obtener las siguientes conclusiones:

1. La disminución de la liberación de noradrenalina, por el bloqueo de los receptores adrenérgicos α_2 provoca a nivel analgésico hipersensibilidad en el sujeto de estudio, clonidina.
2. En relación con las pruebas motoras, la administración del fármaco clonidina, un agonista α_2 adrenérgico, provoca hiperactividad en el grupo de clonidinas macho.
3. La reducción de noradrenalina en el Locus coeruleus y la administración postnatal de clonidina provocan una disminución de la atención y la memoria a corto plazo (1 hora) y largo plazo (24 Horas). Los clonidina adultos presentan neofobia con respecto al objeto novedoso.
4. La noradrenalina secretada por las neuronas del Locus coeruleus es necesaria para aprendizajes que implican la participación de la amígdala, es decir, para el aprendizaje emocional, presentando los ratones clonidina menor recuerdo de la experiencia desagradable en la prueba de evitación pasiva.
5. La disminución funcional de las neuronas dorsolaterales del Locus coeruleus en el clonidina adulto aumenta la latencia de respuesta de sobresalto, aumenta la magnitud de dicha respuesta, y disminuye la inhibición por prepulso, lo que indica que el procesamiento posterior de la

Conclusiones

información sensorial que ocurre en estructuras tronco encefálicas y corticales está alterado o existe una acción refleja en los sujetos adultos (efecto rebote).

6. Tras la aplicación del fármaco clonidina en la etapa neonatal, en los adultos afecta la consolidación de la memoria a corto y largo plazo. Y son incapaces de reconocer los objetos novedosos y no son capaces de realizar la asociación en el condicionamiento del reflejo palpebral. Al igual que sucede con la respuesta de sobresalto, la latencia de la respuesta refleja palpebral presenta una latencia más acentuada en los ratones clonidina.
7. Los ratones tratados con clonidina resultan ser menos sociables y menos reactivos que los animales del grupo silvestre.
8. Los clonidina al presentar cierta ansiedad en varias pruebas, tienden a optar por conductas adictivas como consumir mayor etanol, que los del grupo control, Y se observa que durante el período de abstinencia, no presentan una alteración anómala, ni conducta ansiosa en comparación con el grupo control.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews WD, Parnavelas JG. "Noradrenergic receptor activation alters the migration and distribution of interneurons in the developing neocortex". *Eur J Neurosci.* 2012 Oct; 36(7): 2877-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08274.x
2. Arias Buitrago, Juan Manuel, Rodríguez Ospina, Juan Carlos (2013). "Clonidina para el tratamiento del dolor oncológico: una revisión sistemática de la literatura". Fundación Cardioinfantil. Instituto de Cardiología. Bogotá, Julio de 2013
3. Ansermino M, Basu R, Vandebek C. y Montgomery C. (2003). "Nonopioid additives to local anesthetics for caudal blockade in children: a systematic review". *Pediatr Anaesth* 13: 561-573. Review.
4. Aristoteles. Metafísica de Aristoteles. Segunda edición; Madrid: Edit. Gredos. 1997.
5. Arnsten AF, Li BM. "Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions". *Biol Psychiatry.* 2005 Jun 1; 57(11): 1377-84. Review
6. Aston-Jones G, Cohen JD. "An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance". *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 403-50
7. Bahi A. "Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice" Department of Anatomy, Tawam Medical Campus, CMHS, United Arab Emirates University, Al Ain, United Arab Emirates. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 105 (2013) 83-88
8. Bailey CH, Barco A, Hawkins RD, Kandell ER. "Molecular studies of learning and memory in *Aplysia* and the hippocampus. A comparative analysis of implicit and explicit memory storage". En Byrne JH (ed.) Learning and memory. A comprehensive reference. EUA: Academic Press 2008 vol. 2; pp.11-29.
9. Bear MF, Singer W. "Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline". *Nature.* 1986 Mar 13-19; 320(6058):172-6.
10. Bernard JM. "Postoperative analgesia by intravenous clonidine". *Anesthesiology* 1991; 75: 577-82.
11. Bernard JM. "Effects of oral clonidine premedication and postoperative intravenous infusion on haemodynamic and adrenergic responses during recovery from anaesthesia". *Acta Anaesthesiol Scand* 1991; 35: 54-9.
12. Blanchard CG, Treadwell TW, Blanchard EB. "The impact on patient satisfaction of the introduction of family medicine residents into a model practice facility". *J Fam Pract.* 1977 Jan; 4(1): 133-6.

Bibliografía

13. Blue ME, Parnavelas JG. "The effect of neonatal 6-hydroxydopamine treatment on synaptogenesis in the visual cortex of the rat." *J Comp Neurol*. 1982 Feb 20; 205(2): 199-205.
14. Bouchenafa O, Livingston A. "Autoradiographic localisation of alpha 2 adrenoceptor binding sites in the spinal cord of the sheep". *Resv Vet Sci* 1987; 42: 382-386
15. Bouret S, Sara SJ. "Reward expectation, orientation of attention and locus coeruleus-medial frontal cortex interplay during learning". *Eur J Neurosci*. 2004; 20(3): 791-802.
16. Bouret S, Sara SJ. "Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function". *Trends Neurosci*. 2005; 28(11): 574-82
17. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. (1984). "Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines". *J Pharmacol Exp Ther* 230: 232-6.
18. Bousquet P, Feldman J, Tibirica E, Bricca G, Molines A, Dontenwill M, Belcourt A. (1989). New concepts on the central regulation of blood pressure. Alpha 2-adrenoceptors and "imidazoline receptors". *Am J Med* 87: 10S-13S.
19. Bredfeldt RC, Sutherland JE, Kruse JE. "Efficacy of transdermal clonidine for headache prophylaxis and reduction of narcotic use in migraine patients". *Journal of Family Practice* 1989; 29: 153-6. 1989328360.
20. Bricca G, Dontenwill M, Molines A, Feldman J, Belcourt A, Bousquet P. "The imidazoline preferring receptor: binding studies in bovine, rat and human brainstem". *Eur J Pharmacol*. 1989 Mar 14; 162(1): 1-9.
21. Brownell GL, Sweet WH. (1953). "Localization of brain tumors with positron emitters". *Nucleonics* 11: 40-45.
22. Bruno KJ, y Hess, E.J. (2006). "The α_2c -adrenergic receptor mediates hyperactivity of *colomba* mice, a model of attention deficit hyperactivity disorder". *Neurobiology of disease*. 23: 679-688.
23. Bulme P, Fuxe K. "Pharmacologic studies on the hypotensive effects of clonidine". *Eur J Pharmacol* 1971; 13: 168-72.
24. Cajal SR. "La fine structure des centres nerveux". *Proc R Soc Lond* 1894; 55: 444-468.
25. Calvino-Nuñez, C, Domínguez-del-Toro, E (2014). "Clonidine Treatment Delays Postnatal Motor Development and Blocks Short-Term Memory in Young Mice" * División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0114869
26. Caramazza A, Shelton JR. "Domain specific knowledge systems in the brain: the animate-inanimate distinction". *J Cog Neurosci* (1998)10: 1-34.

27. Cardinal RN, Parkinson JA, Lachenal G, Halkerston KM, Rudarakanchana N, Hall J, Morrison CH, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ. "Effects of selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core, anterior cingulate cortex, and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats". *Behav Neurosci*. 2002 Aug; 116(4): 553-67.
28. Cartford MC, Gould T, Bickford PC. "A central role for norepinephrine in the modulation of cerebellar learning tasks". *Behav Cogn Neurosci Rev* (2004a) 3: 131-8.
29. Cartford MC, Samec A, Fister M, Bickford PC. "Cerebellar norepinephrine modulates learning of delay classical eyeblink conditioning: evidence for post-synaptic signalling via PKA". *Learn Mem* (2004b) 11: 732-737.
30. Chatonnet F, Domínguez del Toro E, Voiculescu O, Charnay P, Champagnat J. (2002). "Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutants". *Eur J Neurosci* 15: 684-692.
31. Clobass Study Group. Low dose clonidine administration in the treatment of mild or moderate essential hypertension: results from a double blind placebo controlled study. *J Hypertens* 1990; 8: 539-46.
32. Cohen L, Katz MA. "Oral clonidine loading for rapid control of hypertension". *Clin Pharmacol Ther* 1978; 24: 11-5.
33. Corkin S. "Acquisition of motor skills after bilateral temporal-lobe excision". *Neuropsychologia* (1968) 6: 255-65.
34. Correa-Sales C, Rabin BC, Maze M. "A hypnotic response to dexmedetomidine, an alpha 2 agonist, is mediated in the locus coeruleus in rats". *Anesthesiology* 1992; 76(6): 948-52.
35. Dalley JW, Theobald DE, Bouger P, Chudasama Y, Cardinal RN, Robbins TW. "Cortical cholinergic function and deficits in visual attentional performance in rats following 192 IgG-saporin-induced lesions of the medial prefrontal cortex". *Cereb Cortex*. 2004 Aug; 14(8): 922-32.
36. Davies RR, Halliday GM, Xuereb JH, Kril JJ, Hodges JR. "The neural basis of semantic memory. Evidence from semantic dementia". *Neurobiol Aging* 2008 (en prensa).
37. Davila Esteban, Davila Eduardo, Jurczu Ivan, Melgar Evangelina, Romero Alcmeon, Aníbal (2008). Protocolo de tratamiento del Síndrome de Abstinencia Alcohólica. Rev. *Argentina de Clínica Neuropsiquiátrica*, Año XVII, Vol. 14, Nº 3, marzo 2008, pp. 20-29.
38. Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ. (1998). Manual de Neurociencia. Ed. Síntesis.
39. Di Chiara G. "Alcohol and dopamine". *Alcohol Health Res World*. 1997; 21(2): 108-14. Review

Bibliografía

40. Domínguez del Toro E, Borday V, Davenne M, Neun R, Rijli F, Champagnat J. (2001). "Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice". *J Neurosci* 21: 5637-5642.
41. Dominguez del Toro E, Rodríguez-Moreno A, Porras-García E, Sánchez-Campusano R, Blanchard V, Laville M, Bohme GA, Benavides J, Delgado-García JM. "An in vitro and in vivo study of early deficits in associative learning in transgenic mice that over-express a mutant form of human APP associated with Alzheimer's disease". *Eur J Neurosci* (2004). 20(7): 1945-1952.
42. Dornelles A, de Lima MN, Grazziotin M, Presti-Torres J, Garcia VA, Scalco FS, Roesler R, Schröder N. (2007). "Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory". *Neurobiol Learn Mem* 88: 137-42.
43. Drachman DA, Arbit S. (1966). "Memory and the hippocampal complex II. Is the memory a multiple process?" *Arch Neurol* 15: 52-61.
44. Dygalo NN, Iushkova AA, Kalinina TS, Surnina N, Mel'nikova LB, Shishkina GT. (2000). « The ontogenetic correlations of noradrenaline level and adrenergic receptor density in the rat brain". *Ontogenez* 31: 53-6.
45. Dygalo NN, Bannova AV, Kalinina TS, Shishkina GT. (2004). "Clonidine increases caspase-3 mRNA level and DNA fragmentation in the developing rats brainstem ». *Brain Res Dev* 152: 225-31.
46. Ebbinghaus H. Memory. A contribution to experimental psychology. New York: Columbia University 1885.
47. Edington RF, Chagnon J-P, Steinburg WM. "Clonidine (dixarit) for menopausal flushing". *Canadian Medical Association Journal* 1980; 123: 23-5. 1981022463.
48. Eisenach JC, Dewan DM, Rose JC, Angelo JM. "Epidural clonidine produces antinociception, but not hypotension, in sheep". *Anesthesiology* 1987; 66(4): 496-501.
49. Eisenach JC, Rauck RL, Buzzanell C, Lysak SZ. "Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain: phase I". *Anesthesiology* 1989; 71: 647-52.
50. Eisenach JC, Detweiler D, Hood D. "Hemodynamic and analgesic actions of epidurally administered clonidine". *Anesthesiology* 1993; 78(2): 277-87.
51. Eisenach JC, DuPen S, Dubois M et al. "Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain". The Epidural Clonidine Study Group Pain 1995; 61: 391-399.
52. Ellis JE. "Premedication with oral and transdermal clonidine provides safe and efficacious sympathectomy". *Anesth Analg* 1994; 79(6): 1133-40.

53. Epstein R. Consciousness, art, and the brain. Lessons from Marcel Proust. *Consciousness Cognition* 2005; 13: 213-240.
54. Fadda F, Rossetti ZL. "Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration". *Prog Neurobiol.* 1998 Nov; 56(4): 385-431.
55. Faust M, Ben-Artzi E, Harel I. "Hemispheric asymmetries in semantic processing: Evidence from false memories for ambiguous words". *Brain Lang* 2008; 105: 220-228.
56. Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. "Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat". *Brain Res.* 2003 Feb 21; 964(1): 107-15.
57. Flores González Julia, Martínez García, Rolando, Herrera Estupiñán, Soledad y Larrondo Muguercia, Hilev (1996). "Clonidina oral en la medicación preanestésica del paciente hipertenso". *Rev Cubana Invest Bioméd*, v.15 n.1, Ciudad de la Habana, ene-jun. 1996, Editorial Ciencias Médicas.
58. Gasparini, S., De Luca, L. A., Colombari, D. S. A., De Paula, P. M., Barbosa, S. P., & Menani, J. V. (2009). Adrenergic mechanisms of the Kölliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. *Neuroscience*, 164(2), 370-379.
59. Ghignone M, Caldrillo O, Quintin L. "Anaesthesia and hypertension: the effect of clonidine on perioperative haemodynamics and isoflurane requirements". *Anesthesiology* 1987; 67: 3-10.
60. Ginsburg J, O'Reilly B, Swinhoe J. "Effect of oral clonidine on human cardiovascular responsiveness: a possible explanation of the therapeutic action of the drug in menopausal flushing and migraine". *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1985; 92: 1169-75. 1986051315.
61. Glassman AH, Stetner F, Walsh T, Raizman PS, Fleiss J, Cooper TB et al. "Heavy smokers, smoking cessation, and clonidine. Results of a double-blind, randomized trial". *JAMA* 1988; 259: 2863-6. 1988215096.
62. Glassman AH, Covey LS, Dalack GW, Stetner F, Rivelli SK, Fleiss J et al. "Smoking cessation, clonidine, and vulnerability to nicotine among dependent smokers". *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1993; 54: 670-9. 1994101785.
63. Goeders NE, Irby BD, Shuster CC, Guerin GF. "Tolerance and sensitization to the behavioral effects of cocaine in rats: relationship to benzodiazepine receptors". *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 May-Jun; 57(1-2): 43-56.
64. Gold MS. "Opiate addiction and the locus coeruleus: The clinical utility of clonidine, naltrexone, methadone, and buprenorphine". *The Psychiatric Clinics of North America* 1993; 16: 61-73. 1993205610.

Bibliografía

65. Gold PE. "Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs. amnesia". *Neurobiol Learn Mem* 2008; 89: 201-211.
66. Gollin ES. "Developmental studies of visual recognition of incomplete objects". *Percept Mot Skills* 1960; 11: 289-98.
67. Gorter J, Kamphuis W, Huisman E, Bos N, Mirmiran M. (1990). "Neonatal clonidine treatment results in long-lasting changes in noradrenaline sensitive and kindling epileptogenesis". *Brain Research* 535: 62-66.
68. Goudas LC, Carr DB, Filos KS et al. "The spinal clonidine- opioid analgesic interaction: from laboratory animals to the postoperative ward - a literature review of preclinical and clinical evidence". *Analgesia* 1998; 3: 277-90.
69. Gourlay SG, Forbes A, Marriner T, Kutin J, McNeil J. "A placebo-controlled study of three clonidine doses for smoking cessation". *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1994; 55(1):64-9. 1994130495.
70. Gourlay SG, Benowitz NL. "Is clonidine an effective smoking cessation therapy?" *Drugs* 1995; 50: 197-207. 1996131150.
71. Gourlay SG, Stead LF, Benowitz NL. (2008). "Clonidina para el abandono del hábito de fumar" (revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2008 N° 4. Oxford: Update Software Ltd).
72. Griffin WC, McGovern RW, Bell GH, Randall PK, Middaugh LD, Kennerly S. "Interactive effects of methylphenidate and alcohol on discrimination, conditioned place preference and motor coordination in C57BL/6J mice". *Psychopharmacology* (2013) 225: 613-625.
73. Gruart A, Schreurs BG, Domínguez del Toro E y Delgado-García JM. (2000). "Kinetic and frequency-domain properties of reflex and conditioned eyelid responses in the rabbit". *J Neurophysiol* 83: 836-852.
74. Guimarães L, Domínguez-del-Toro E, Chatonnet F, Wrobel L, Pujades C, Monteiro LS and Champagnat J. (2007). "Exposure to retinoic acid at the onset of hindbrain segmentation induces episodic breathing in mice". *Eur J Neurosci* 25: 3526-3536.
75. Gustafson I, Miyauchi Y, Wieloch TW. (1989). "Postischemic administration of idazoxan, an alpha-2 adrenergic receptor antagonist, decreases neuronal damage in the rat brain". *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 171-4.
76. Gustafson I, Westerberg E, Wieloch T. (1990). "Protection against ischemia-induced neuronal damage by the alpha 2-adrenoceptor antagonist idazoxan: influence of time of administration and possible mechanisms of action". *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 885-94

77. Guyenet PG, Cabot JB. "Inhibition of sympathetic preganglionic neurons by catecholamines and clonidine: mediation by an alpha-adrenergic receptor". *J Neurosci* 1981; 1(8): 908-17.
78. Hao-W, Young D, Wei H. "Effect of clonidine on cigarette cessation and in the alleviation of withdrawal symptoms" [published erratum appears in *British Journal of Addiction* 1988; 83: 1467]. *British Journal of Addiction*. 1988; 83: 1221-6. 1989051247.
79. Happe HK, Bylund DB, Murrin LC. (1999). "Alpha-2 adrenergic receptor functional coupling to G proteins in rat brain during postnatal development". *J Pharmacol Exp Ther* 288: 1134-42.
80. Happe HK, Coulter CL, Gerety ME, Sanders JD, O'Rourke M, Bylund DB, Murrin LC. (2004). "Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: An autoradiographic study." *Neuroscience* 123(1): 167-178.
81. Hassenbusch SJ, Gunes S, Wachsman S, Willis KD. "Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I-II study". *Pain Med* 2002; 3: 313-323.
82. Hebb DO. The organization of behavior. New York. Wiley. 1949.
83. Hernandez PJ, Abel T. "The role of protein synthesis in memory consolidation. Progress amid decades of debate". *Neurobiol Learn Mem* 2008; 89: 293-311.
84. Heyes CM. "Social learning in animals: categories and mechanisms". *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1994 May; 69(2): 207-31. Review
85. Hilleman DE, Mohiuddin SM, Delcore MG, Lucas BD. "Randomized, controlled trial of transdermal clonidine for smoking cessation". *The Annals of Pharmacotherapy* 1993; 27(9): 1025-8. 1994033819.
86. Hossmann V, Maling TJ, Hamilton CA, Reid JL, Dollery CT. (Aug 1980). "Sedative and cardiovascular effects of clonidine and nitrazepam". *Clin Pharmacol Ther* 28 (2):pp. 167-76. PMID 739818.
87. Houston M. "Treatment of hypertensive urgencies with oral clonidine loading and titration". *Arch Intern Med* 1989; 149: 105-7.
88. Hughes J.R, Stead L, Lancaster T. "Antidepressants for smoking cessation" (*Cochrane Review*). In The Cochrane Library 3, 2001. Oxford: Update Software. CD000031.
89. Imperial Cancer Research Fund General Practice Research Group. Effectiveness of a nicotine patch in helping people stop smoking: results of a randomised trial in general practice. *BMJ* 1993; 306: 1304-8. 1993299146.

Bibliografía

90. Ishai A, Ungerleider LG, Martin A, Schouter JL, Haxby JV. (1999). "Distributed representation of objects in the ventral visual pathway". *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 9379-9384.
91. Iushkova AA, Dygalo NN. (1995). "Changes in the number of alpha 2- and beta-adrenoreceptors in the brain stem and cerebral cortex of rats in ontogeny". *Fiziol Zh Im I M Sechenova* 81: 7-11
92. Jacquin TD, Borday V, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Ghilini G, Kato F, Charnay P y Champagnat J. (1996). "Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox-20* knockout mice". *Neuron* 17: 747-758.
93. Jaker M. "Nifedipine versus oral clonidine in the treatment of urgent hypertension". *Arch Inter Med* 1989; 149: 260-5.
94. James W. The principles of psychology. Tercera edición. United Kingdom. Courier Dover Publications. 1950.
95. Jentsch JD y Anzivino LA. (2004). "A low dose of the alpha 2 agonist clonidine ameliorates the visual attention and spatial working memory deficits produced by phencyclidine administration to rats" *Psychopharmacology* 175: 76-83.
96. Kaliste-Korhonen E. y Eskola S. "Fighting in NIHJ5 male mice: consequences for behaviour in resident-intruder tests and physiological parameters". National Laboratory Animal Center, University of Kuopio, PO Box 1627, FIN-70211 Kuopio and Laboratory of Toxicology, National Public Health Institute, PO Box 95, FIN-70701 Kuopio, Finland
97. Kamisaki Y, Hamada T, Maeda K, Ishimura M, Itoh T. "Presynaptic alpha 2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes". *J Neurochem* 1993; 60(2): 522-6
98. Kandel ER. "The biology of memory: a forty-year perspective. *J Neurosci*. 2009 Oct 14; 29(41): 12748-56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3958-09.2009.
99. Kandel ER. "The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses". *Biosci Rep*. 2004 Aug-Oct; 24(4-5): 475-522.
100. Kandel ER, Taub L. "Mechanism of prolonged heterosynaptic facilitation". *Nature* 1964; 202:145.
101. Kandel ER, Pittenger C. "The past, the future and the biology of memory storage". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999 Dec 29; 354(1392): 2027-52. Review
102. Kandel ER. Genes, nerve cells, and the remembrance of things past. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1989 Spring; 1(2): 103-25. Review.

103. Kandel ER, Klein M, Castellucci VF, Schacher S, Goelet P. Some principles emerging from the study of short- and long-term memory". *Neurosci Res.* 1986 Sep; 3(6): 498-520. Review.
104. Kameneztsky G, Kuenya L, Pedrón V y Mustaca A. Condicionamiento delugar en rats y etanol. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy* 2007, 7, 3, 321-333.
105. Koob GF, Le Moal M. "Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis". *Neuropsychopharmacology.* 2001 Feb; 24(2): 97-129. Review
106. Kreek MJ, Koob GF. "Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways". *Drug Alcohol Depend.* 1998 Jun-Jul; 51: (1-2):23-47. Review
107. Kreiman G, Koch C, Fried I. (2000). "Category-specific visual responses of single neurons in the human medial temporal lobe". *Nat Neurosci* 3: 946–953.
108. Kumandas S, Akcakus M, Coskum A y Gumus H. (2004). "Joubert syndrome: review and report of seven new cases". *Eur J Neurol* 11: 505-510.
109. LaLumiere RT, Nguyen LT, and McGaugh JL. 2004. "Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: Involvement of noradrenergic and cholinergic systems". *Eur J Neurosci* 20:2804-2810.
110. Lashley KS. "Brain mechanism and intelligence: A Quantitative study of injuries to the brain". Chicago, Univ of Chicago Press 1929.
111. Laviolette SR, van der Kooy D. "Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area". *Mol Psychiatry.* 2003 Jan; 8(1): 50-9, 9
112. Le Moal M, Stinus L, Simon H. "Increased sensitivity to (+)amphetamine self-administered by rats following meso-cortico-limbic dopamine neurone destruction". *Nature.* 1979 Jul 12; 280(5718): 156-8
113. Le Moal M, Koob GF. "Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives". *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007 May-Jun; 17(6-7): 377-93. Epub 2006 Dec 12.
114. Leckman JF, Detlor J, Harcherik DF, Ort S, Shaywitz BA, Cohen DJ. "Short- and long-term treatment of Tourette's syndrome with clonidine: a clinical perspective". *Neurology* 1985; 35: 343-51. 1985138507.
115. Leong MS, Calabrese JF, Heit G. "Intraventricular administration of morphine and clonidine". *Anesthesiology* 2001; 94: 1141-3.

Bibliográfia

116. Lumsden A, Krumlauf R. "Patterning the vertebrate neuraxis". *Science*. 1996 Nov 15; 274(5290): 1109-15. Review
117. Maden M. "Retinoic acid and limb regeneration--a personal view". *Int J Dev Biol*. 2002; 46(7): 883-6.
118. Maiese K, Pek L, Berger SB, Reis DJ. (1992). "Reduction in focal cerebral ischemia by agents acting at imidazole receptors". *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 53-63.
119. Manhem P, Nilsson LH, Moberg A, Wadstein J, Hokfelt B. "Alcohol withdrawal: effects of clonidine treatment on sympathetic activity, the renin-aldosterone system, and clinical symptoms". *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 1985; 9: 238-43. 1985249173.
120. Mansouri J, Panigrahy A, Assmann SF, Kinney HC. "Distribution of alpha 2-adrenergic receptor binding in the developing human brain stem". *Pediatr Dev Pathol*. 2001 May-Jun; 4(3): 222-36.
121. Martin A, Haxby JV, Lalonde FM, Wiggs CL, Ungerleider LG. "Discrete cortical regions associated with knowledge of color and knowledge of action". *Science* 1995; 379: 649-652.
122. Martin A, Chao LL. "Semantic memory and the brain: Structure and processes". *Curr Neurobiol* 2001; 11: 194-201.
123. McGonigle BO, Chalmers M. "Are monkeys logical?". *Nature*. 1977. 23; 267(5613): 694-6
124. Miller EK, Cohen JD. "An integrative theory of prefrontal cortex function". *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 167-202. Review
125. Milner B. "The memory defect in bilateral hippocampal lesions". *Psychiatric Research Report* 1959; 11: 43-58.
126. Milner B, Corkin S, Teuber HL. "Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome 14 year follow-up study of HM". *Neuropsychologia* 1968; 6: 215-34.[Links]
127. Milner B. "Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man". *Clin Neurosurg* 1972; 19: 421-46.
128. Milner B, Squire LR, Kandell ER. "Cognitive neuroscience and the study of memory". *Neuron* 1998; 20: 445-468.
129. Milner B. "The medial temporal-lobe amnesic syndrome". *Psychiatr Clin N Am* 2005; 28: 599-611.
130. Mirmiran M, Brenner E, van der Gugten J, Swaab DF. (1985). "Neurochemical and electrophysiological disturbances mediate developmental behavioral alterations produced by medicines". *Neurobehav Toxicol Teratol* 6: 677-83.

131. Mishkin M. "Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus". *Nature* 1978; 273: 297-298.
132. Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. "From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system". *Prog Neurobiol.* 1980; 14(2-3): 69-97. Review
133. Mondaca M, Soto-Moyano R, Pérez H, Valladares L, Sierralta W, Fernández V, *Hernández A. INTA, Universidad de Chile * ICBM Facultad de Medicina Universidad de Chile. ("Clonidine inhibits *in vivo* the transcallosal long-term potentiation in the rat: Functional relevancy in nutritional studies")
134. Mountcastle V. "Modality and topographic properties of single neurons of cat somatosensory cortex". *J Neurophysiol* 1957; 20: 408-434.
135. Munera A, Gruart A, Muñoz MD, Fernández-Mas R, Delgado-García JM. (2001). "Hippocampal pyramidal cell activity encodes conditioned stimulus predictive value during classical conditioning in alert cats". *J Neurophysiol* 86: 2571-2582.
136. Munro HM. "The cardiovascular response to ketamine: the effects of clonidine and lidocaine". *Acta Anesthesiol Scand* 1993; 37(1): 758-63.
137. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2002). "Methylphenidate and Clonidine Help Children with ADHD and Tics".
138. Neusy AJ, Lowenstein J. "Blood pressure variability following withdrawal of propranolol and clonidine". *J Clin Pharmacol* 1989; 29: 18-24.
139. Niaura R, Brown RA, Goldstein MG, Murphy JK, Abrams DB. "Transdermal clonidine for smoking cessation - a double-blind randomized dose-response study". *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 1996; 4: 285-91.
140. Ono H, Mishima A, Ono S, Fukuda H, Vasko MR. "Inhibitory effects of clonidine and tizanidine on release of substance P from slices of rat spinal cord and antagonism by alpha-adrenergic receptor antagonists". *Neuropharmacology* 1991; 30(6): 585-9.
141. Osterheld-Haas MC, Van der Loos H, Hornung JP. "Monoaminergic afferents to cortex modulate structural plasticity in the barrel field of the mouse". *Brain Res Dev Brain Res.* 1994 Feb 18; 77(2): 189-202.
142. Paalzow L. (1974). "Analgesia produced by clonidine in mice and rats". *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 26: 361-363.
143. Packard MG, Hirsh R, White NM. "Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze task: evidence for multiple memory systems". *J Neurosci* 1989; 9: 1465-72.

Bibliografía

144. Packard MG, McGaugh JL. "Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems". *Behav Neurosci* 1992; 106: 439-46.
145. Packard MG, McGaugh JL. "Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning". *Neurobiol Learn Mem* 1996; 65: 65-72.
146. Packard MG. "Exhumed from thought: Basal ganglia and response learning in the plus maze". *Behav Brain Res* 2009 (en prensa).
147. Parnavelas JG, Blue ME. "The role of the noradrenergic system on the formation of synapses in the visual cortex of the rat". *Brain Res.* 1982 Jan; 255(1): 140-4
148. Pavlov IP. Conditioned reflex. London: Oxford University Press. 1927.
149. Penfield W, Milner B. "Memory deficits induced by bilateral lesions in the hippocampal zone". *Arch Neurol Psychiatry* 1958; 79: 475-97.
150. Pettit HO, Ettenberg A, Bloom FE, Koob GF. "Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats". *Psychopharmacology* (Berl). 1984; 84(2): 167-73
151. Piazza PV, Rouge-Pont F, Deroche V, Maccari S, Simon H, Le Moal M. "Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6; 93(16): 8716-20.
152. Piazza PV, Le Moal M. "Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications". *Brain Res Rev.* 1997 Dec; 25(3): 359-72. Review.
153. Piazza PV, Le Moal M. "The role of stress in drug self-administration". *Trends Pharmacol Sci.* 1998 Feb; 19(2): 67-74. Review.
154. Polarz N. "Oral clonidine premedication prevents the rise on intraocular pressure following succinyl-choline administration". *Ger J Ophthalmol* 1993; 2(2): 97-9.
155. Poldrack RA, Prabakaran V, Seger C, Gabrieli JDE. "Striatal activation during cognitive skill learning". *Neuropsychol* 1999; 13:564-74.
156. Poldrack RA, Wagner DA, Prull MW, "Desmond JE. Glover GH et al. Functional specialization for semantic and phonological processing in the left inferior frontal cortex". *Neuroimage* 1999; 10: 15-35.
157. Poldrack RA, Packard MG. "Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies". *Neuropsychol* 2003; 1497: 1-7.

158. Porras-García E*, Cendelin J*, Domínguez delToro, E*, Vozeh F y Delgado-García JM. (2005). "Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition, and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice". *Eur J Neurosci* 21: 979-988.
159. Quintin L. "Oxygen update after major abdominal surgery: effect of clonidine". *Anesthesiology*. 1991. 74: 236-41.
160. Rains Dennis G. Sistemas de memoria. En: Principios de neuropsicología humana. Primera edición. México; Mc Graw Hill. 2004. pp: 241-286.
161. Ramos Castilla, M. (2013) "Consecuencias funcionales a largo plazo de tratamientos postnatales con Metilfenidato y con Idazoxan en un modelo de ratón para el Estudio del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad". Biblioteca de la Universidad Pablo de Olavide. Sevilla
162. Rassnick S, Stinus L, Koob GF. "The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat". *Brain Res*. 1993 Sep 24; 623(1): 16-24
163. Roediger III HL, Zaromb FM, Goode MK. A typology of memory terms. En: Byrne JH (ed.). Learning and memory. A comprehensive reference. EUA. Academic Press 2008 vol. 1; pp.11-24.
164. Roozendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL. (2008). "Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory". *Neurobiology of Learning and Memory* 90: 576-579.
165. Rose FC. "Persistent memory defect following encephalitis". *Brain* 1960; 83: 195-212.
166. Routtenberg A, Rekart JL. "Post-translational modification as the substrate for long-lasting memory". *Trends Neurosci* 2005; 28: 12-19.
167. Russell MAH, Stapleton JA, Feyerabend C, Wiseman SM, Gustavsson G, Saw U, Connor P. "Targeting heavy smokers in general practice: randomised controlled trial of transdermal nicotine patches". *BMJ* 1993; 306: 1308-12. 1993299147.
168. Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, Kobilka BK, Scheinin M. "Adrenergic alpha2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice". *J Neurosci* 1998; 18(8): 3035-42
169. Sawa M, Ueki Y, Arita M, Harada T. "Preliminary report on the amygdaloidectomy on the psychotic patients, with interpretation of oral-emotional manifestation in schizophrenics". *Folia Psychiatrica Neurologica Japonica* 1954; 7: 309-29.

Bibliografía

170. Schapiro NA. "Dude, you don't have Tourette's: Tourette's syndrome, beyond the tics". *Pediatr Nurs* 2002 May-Jun; 28(3): 243-6, 249-53. PMID 12087644
171. Schulz B, Fendt M, Schnitzler HU. "Clonidine injections into the lateral nucleus of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle". *Eur J Neurosci*. 2002; 15(1): 151-7.
172. Schunk D.H. (1997). Teorías del aprendizaje. Pearson Educación
173. Scoville WB. "The limbic lobe in man". *J Neurosurg* 1954; 11: 64-6.
174. Scoville WB, Milner B. "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; 20: 11-21.
175. Scoville WB, Correll RE. "Memory and the temporal lobe". *Acta Neurochirurgica* 1973; 28: 251-258.
176. Segal IS, Jarvis DJ, Duncan SR, White PF, Maze M. "Clinical efficacy of oraltransdermal clonidine combinations during the perioperative period". *Anesthesiology* 1991; 74(2): 220-5.
177. Shacter DL. "Implicit memory: History and current status". *J Exp Psychol Learn Mem Cog* 1987; 13: 501-518.
178. Shacter DL. "Forgotten ideas, neglected pioneers: Richard Semon and the history of memory. Philadelphia". *Psychology Press* 2001.
179. Shishkina GT, Kalinina TS, Sournina NY, Dygalo NN. (2001). "Effects of antisense to the (alpha) 2A-adrenoceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats". *J Neurosci* 21: 726-731.
180. Shishkina GT, Kalinina TS, Sournina NY, Saharov DG, Kobzev VF, Dygalo NN. (2002). "Effects of antisenseoligodeoxynucleotide to the alpha 2A-adrenoceptors on the plasma corticosterone level and on elevated plus-maze behavior in rats". *Psychoneuroendocrinology* 27: 593-601.
181. Shishkina GT, Kalinina TS, Masnavieva LB, Dygalo NN. (2003). "Cortical alpha 2a adrenoreceptors involved in the inhibitory control of motor activity in neonatal rats". *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 53: 637-40.
182. Shishkina GT, Kalinina TS, Popova NK, Dygalo NN. (2004). "Influence of neonatal short-term reduction in brainstem alpha 2A-adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats". *Behav Neurosci* 118: 1285-92.
183. Silagy C, Lancaster T, Stead L, Mant D, Fowler G. Nicotine replacement therapy for smoking cessation (Cochrane Review). In: The Cochrane Library 3, 2001. Oxford: Update Software CD000146.
184. Skinner BF. "Drive and reflex strength: I" *J Gen Psychol* 1932; 6: 22-37.

185. Smith CN, Squire L. "Medial temporal lobe activity during retrieval of semantic memory is related to the age of memory". *J Neurosci* 2009; 29: 930-938.
186. Soto-Moyano R, Hernandez A, Perez H, Ruiz S, Galleguillos X, Belmar J. (1991). "Yohimbine early in life alters functional properties of interhemispheric connections of rat visual cortex". *Brain Res Bull.* 26(2): 259-63
187. Spilalewitz S. "Use of oral clonidine for rapid titration of blood pressure in severe hypertension". *Chest* 1983; 83(Suppl): 404-7.
188. Squire LR. "Mechanisms of memory". *Science* 1986; 232: 1612-1619.
189. Squire LR. "Memory systems of the brain: A brief history and current perspective". *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82: 171-177.
190. Tamashiro KLK, Wakayama T, Blanchard RJ, Blanchard DC y Yanagimachi R. (2000). "Postnatal Growth and Behavioral Development of Mice Cloned from Adult Cumulus Cells". *Biol of Reprod* 63: 328-334.
191. Tamsen A, Gordh TE. "Epidural clonidine produces analgesia". *Lancet* 1984; ii: 231-232.
192. Thanos PK, Bermeo C, Rubinstein M, Suchland KL, Wang GJ, Grandy DK, Volkow ND (2010) Conditioned place preference and locomotor activity in response to methylphenidate, amphetamine and cocaine in mice lacking dopamine D4 receptors. *J Psychopharmacology*, **24**: 897-904.
193. Thorndike EL. "Memory for paired associates". *Psychological Rev* 1909; 15: 122-138.
194. Tibiriça E, Feldman J, Mermet C, Gonon F, Bousquet P. (1991). "An imidazoline-specific mechanism for the hypotensive effect of clonidine: a study with yohimbine and idazoxan". *J Pharmacol Exp Ther* 256: 606-13.
195. Tilley M. and Howard H. "The Effects of Methylphenidate on Knockin Mice with a Methylphenidate-Resistant Dopamine Transporter". *Departments of Pharmacology (M.R.T., H.H.G.) and Psychiatry (H.H.G.), journal of pharmacology and experimental therapeutics* V. 327, N°. 2. Copyright © 2008 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET 327:554–560, 2008
196. Transdermal Nicotine Study Group. Transdermal nicotine for smoking cessation. Six-month results from two multicenter controlled clinical trials. *JAMA* 1991; 266: 3133-8. 1992065541.
197. Tomkins DM, Sellers EM. "Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence". *CMAJ*. 2001 Mar 20; 164(6): 817-21. Review.

Bibliografía

198. Tulving E. How many memory systems are there? *American Psychologist* 1985; 40:385-398.
199. Tulving E, Schacter DL. "Priming and human memory systems". *Science* 1990; 247: 301-306.
200. U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking - Nicotine Addiction. A report of the Surgeon General. US DHHS. 1988.
201. Velly L, Cardo B, Kempf E, Mormede P, Nassif-Caudarella S, Velly J. (1991). "Facilitation of learning consecutive to electrical stimulation of the locus coeruleus: cognitive alteration or stress-reduction?" *Prog Brain Res* 88: 555-69.
202. Vetulani J. Drug addiction. Part II. "Neurobiology of addiction". *Pol J Pharmacol*. 2001 Jul-Aug; 53(4): 303-17. Review.
203. Victor M, Angevine JB, Mancall EL, Fisher CM. "Memory loss with lesions of hippocampal formation". *Arch Neurol* 1961; 5: 244-263.
204. Viemari JC, Bevengut M, Coulon P, Hilaire G. (2003). "Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate". *J Neurophysiol* 91: 746-58.
205. Viemari JC, Maussion G, Benvenut M, Burnet H, Pequignot JM, Nepote V, Pachnis V, Simonneau M, Hilaire G. (2005). "Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm". *Eur J Neurosci* 22: 2403-12
206. Villagra VG, Rosenberger JL, Girolami S. "Transdermal clonidine for smoking cessation: A randomized, double blind, placebo controlled trial". *Circulation* 1989; 80 Suppl II (4): 11-58.
207. Villagra VG. "Transdermal clonidine for smoking cessation: a randomized trial". *Clinical Research* 1991; 39: 640A.
208. Von Bekhterev M. "Demonstration eines gehirns mit zerstörung der vorderen und inneren theile der hirnrinde beider schläfenlappen". *Neurologisches Zeitblatt* 1900; 19: 990-1.
209. Wang F, Lidow MS. "Alpha 2A-adrenergic receptors are expressed by diverse cell types in the fetal primate cerebral wall". *J Comp Neurol*. 1997 Feb 24; 378(4): 493-507.
210. Warnecke M, Oster H, Revelli JP, Álvarez Bolado G, Eichele G. (2005). "Abnormal development of the locus coeruleus in Ear2 (Nr2f6)-deficient mice impairs the functionality of the forebrain clock and affects nociception". *Genes and Dev* 19: 614-625.
211. Warrington E, Weiskrantz L. "New method for testing long-term retention with special reference to amnesic patients". *Nature* 1968; 4: 217-972.

212. Weiskopf RB. "Fentanyl, esmolol and clonidine blunt the transient cardiovascular stimulation induced by desflurane in humans". *Anesthesiology* 1994; 81(6): 1350-5.
213. Weiss F, Porrino LJ. "Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges". *J Neurosci*. 2002 May 1; 22(9): 3332-7.
214. Wikberg JE, Uhlén S. (1990). "Further characterization of the guinea pig cerebral cortex idazoxan receptor: solubilization, distinction from the imidazole site, and demonstration of cirazoline as an idazoxan receptor-selective drug". *J Neurochem* 55: 192-203.
215. Wingard JC, Packard MG. "The amygdala and emotional modulation of competition between cognitive and habit memory". *Behav Brain Res* 2008; 193: 126-131.
216. Wurst FM, Rasmussen DD, Hillemacher T, Kraus T, Ramskogler K, Lesch O, Bayerlein K, Schanze A, Wilhelm J, Junghanns K, Schulte T, Dammann G, Pridzun L, Wiesbeck G, Kornhuber J, Bleich S. "Alcoholism, craving, and hormones: the role of leptin, ghrelin, prolactin, and the pro-opiomelanocortin system in modulating ethanol intake". *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Dec; 31(12): 1963-7.
217. Wurtz RH. "Steady potential shifts during arousal and sleep in the cat. Electroencephalogram". *Clin Neurophysiol* 1965; 18: 649-662.
218. Zola-Morgan S, Squire LR. "Preserved learning in monkeys with medial temporal lesions: Sparing of motor and cognitive skills". *J Neurosci* 1984; 4: 1072-1085.
219. Zubaran C, Fernandes JG, Rodnight R. Wernicke–Korsakoff Syndrome. *Postgrad Med* 1997; 73: 27-31.

8.WEBGRAFÍA

1. «Clonidine». Drugs.com.
2. Dialnet.unirioja.es
3. <http://www.bibliovirtual.wordpress.com/pubmed>
4. <http://www.elsevier.es>
5. <http://www.neurologia.com>
6. <http://www.neurociencia.cl>
7. <http://www.psiquiatria.com>
8. <http://www.revneurol.com>
9. <http://www.revneuropsi.com.ar>
10. <http://www.sen.es>
11. <http://www.senc.es>
12. <http://www.neuropsicologíamadrid.com>
13. http://www.med.unne.edu.ar/revista/revista101/sist_nervioso_autonomo.htm
14. <http://www.fma.org.mx/Portals/0/congresos/IIICVMA/scafati.pdf>
15. <http://www.cun.es/areadesalud/medicamentos/aparato-cardiovascular/antihipertensivos/hipotensores-de-accion-central/clonidina/>
16. http://www.vademecum.es/principios_activos/ficha/C02AC01/Agonistas%20del%20receptor%20de%20imidazolidina/?action=open
17. http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g61_organofosforados/cloni.htm
18. <http://www.neuropediatria.com.py/book/Aprendizaje/clonidina.htm>
19. <http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Fisiologia/SNA.htm>
20. <http://www.jefferson.edu/neurosurgery/research/cocoeffect.cfm>
21. <http://www.jefferson.edu/neurosurgery/research/cocoeffect.cfm>
22. Neurociencias.udea.edu.co

